

**Etablierung des humanen Harnblasenkarzinoms im
orthotopen Mausmodell zur Bewertung der
intravesikalen Radioimmuntherapie mit einem
Wismuth-213 (^{213}Bi) markierten monoklonalen
anti-EGFR-Antikörper**

Birgit Pfof

Aus der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar
Technische Universität München
Direktor: Prof. Dr. M. Schwaiger

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. med. Dr. phil. Reingard Senekowitsch-Schmidtke

Vorgelegt über den Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
Institut für Tierpathologie
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Wolfgang Schmahl

**Etablierung des humanen Harnblasenkarzinoms im orthotopen Mausmodell zur
Bewertung der intravesikalen Radioimmuntherapie mit einem Wismuth-213
(²¹³Bi) markierten monoklonalen anti-EGFR-Antikörper**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Birgit Pfof
aus Bonn / Nordrhein-Westfalen

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Schmahl
Korreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Aigner Univ.-Prof. Dr. Gabius Univ.-Prof. Dr. Wolf Univ.-Prof. Dr. Müller

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Meinen Eltern
Jochen und Rosemarie Kielholz

*Do kann I moch'n wos I wül
Do bin I her do kea I hin
Do schmüzt des Eis von meiner Sö
Wia von am Gletscher im April
A wenn ma's schon vergessn ham'
I bin dei Apfel - du mei Stamm.*

(R. Fendrich)

Inhalt

Abkürzungen	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Zielsetzung	5
2 LITERATURÜBERSICHT	6
2.1 Das Harnblasenkarzinom	6
2.1.1 Klassifikation des humanen Harnblasenkarzinoms	7
2.1.2 Stand der Therapie	8
2.1.3 Der EGF-Rezeptor und spezifische anti-EGFR-Antikörper für die Therapie des Harnblasenkarzinoms	10
2.2 Radioimmuntherapie von Tumoren	12
2.2.1 Prinzip der Radioimmuntherapie	12
2.2.2 Monoklonale Antikörper als Träger des Radionuklids	14
2.2.3 α - und β -Strahler für die Radioimmuntherapie	15
2.2.4 α -Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi	18
2.2.5 Bindung des ^{213}Bi an den Antikörper	19
2.2.6 Toxizität	21
2.3 α-Radioimmuntherapie am Mausmodell	23
3 MATERIAL UND METHODEN	26
3.1 Materialien, Chemikalien und pharmakologische Wirkstoffe	26
3.1.1 Anästhesie und Analgesie	28
3.1.2 Zellkulturmedien	29
3.2 Geräte	30
3.3 Verwendete Antikörper	31
3.3.1 Anti-EGFR Antikörper EMD 72000	31
3.3.2 Anti-EPCAM Antikörper CK 931	31
3.3.3 Anti-MUC1 Antikörper CD227 (C595 NCR48)	31
3.4 Radionuklide und Radiotracer	32
3.4.1 Wismuth-213 (^{213}Bi)	32
3.4.1.1 $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator	33
3.4.1.2 Chelatierung der Antikörper	34
3.4.1.3 Markierung der chelatierten Antikörper mit ^{213}Bi	35
3.4.2 ^{11}C -Cholin	36

3.5 Zelllinien und Zellkultur	36
3.5.1 Zelllinien des humanen Harnblasenkarzinoms	36
3.5.2 Kultivierung der Zellen	38
3.5.3 Transfektion der Zelllinie EJ 28 mit Luciferase	38
3.6 Bindungsstudien	39
3.7 Scatchard Analyse und Internalisierungskinetik	40
3.8 In vitro Biolumineszenz-Imaging	42
3.9 Klonogener Assay (24-well-plate clonogenic assay)	43
3.10 Tierexperimente	45
3.10.1 Versuchstiere und Haltung	45
3.10.2 Anästhesie der Maus	45
3.10.3 Etablierung des Urothelkarzinoms in der murinen Harnblase	46
3.10.3.1 Darstellung des Harnblasenkarzinoms in vivo	47
<i>Sonografie</i>	47
<i>Biolumineszenz Imaging</i>	48
<i>PET</i>	49
3.10.4 Bioverteilung von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk	50
3.10.4.1 Biodistribution	50
3.10.4.2 Verteilung von freiem und MAk-gebundenem ^{213}Bi in der Niere	52
3.10.5 Therapiestudien mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk und Mitomycin C	52
3.10.6 Tötung und Sektion der Maus	54
3.11 Histologie	55
3.11.1 Herstellung von Kryostat-Gewebeschnitten	55
3.11.2 Autoradiographie der Nierenschnitte mittels Micro-Imager	56
3.11.3 Immunhistochemischer Nachweis des EGF-Rezeptors	56
<i>IHC-Protokoll</i>	57
3.12 Statistik der Überlebensdaten	57
4 ERGEBNISSE	59
4.1 Markierung der Antikörper mit ^{213}Bi	59
4.2 Charakterisierung der verwendeten Harnblasenkarzinom-Zelllinien	60
4.2.1 Proliferation der Zellen in vitro	60
4.2.2 Bindung des Radioimmunkonjugates an die Zelllinien	61
4.2.3 Quantifizierung der EGF-Rezeptorexpression mittels Scatchard-Analyse	64
4.2.4 In vitro Biolumineszenz-Imaging und klonogener Assay nach Inkubation der Zelllinie EJ 28-luc mit dem Radioimmunkonjugat	65
4.2.5 Grad der Internalisierung des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk	66

4.3	Tierexperimente	68
4.3.1	Etablierung des Harnblasenkarzinoms	68
4.3.2	In vivo-Darstellung der Tumorentwicklung	69
4.3.2.1	Sonographie	69
4.3.2.2	Biolumineszenz-Imaging	70
4.3.2.3	^{11}C -Cholin PET	72
4.3.3	Bioverteilung des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk im murinen Organismus nach intravenöser und intravesikaler Applikation	74
4.3.4	Verteilung von ^{213}Bi und ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk im Nierengewebe	78
4.3.5	Therapeutische Effizienz	79
4.3.5.1	Überlebenszeit nach EJ 28-Zellinokulation	79
4.3.5.2	Überlebenszeit nach lokoregionaler Therapie	81
4.3.5.3	Kontrolle der therapeutischen Effizienz mittels Biolumineszenz Imaging	88
4.4	Histologie	90
4.4.1	Expression von EGFR des xenotransplantierten Blasentumors	90
5	DISKUSSION	93
5.1	In vitro Studien	93
5.2	Etablierung und Darstellung des orthotopen Xenotransplantats	95
5.3	Bioverteilung und Toxizität des ^{213}Bi-anti-EGFR-MAk	102
5.4	Therapeutische Effizienz der Radioimmuntherapie	105
	Ausblick	110
6	ZUSAMMENFASSUNG	111
7	SUMMARY	113
8	LITERATURVERZEICHNIS	115
9	ANHANG	130
9.1	Tabellenverzeichnis	130
9.2	Abbildungsverzeichnis	130
10	DANKSAGUNG	134

Abkürzungen

% inj. Akt./g	Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe
μCi	Mikro-Curie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
AK	Antikörper
²¹³ Bi	Wismuth-213
Bq	Becquerel (SI-Einheit der Radioaktivität)
BSA	Bovines Serum Albumin
CCD	Charge-coupled device (Biolumineszenz Kamera)
Ci	Curie (3,7 x 10 ¹⁰ radioaktive Zerfälle pro Sekunde, alte Einheit der Radioaktivität)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computer-Tomographie
d	Tag
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
FKS	Fetales Kälberserum
Gy	Gray (Einheit der Energiedosis)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horse-Reddish-Peroxidase
HWZ	Halbwertszeit
i.p.	intraperitoneal
IQA	Interquartalsabstand
ITLC	Instant Thin Layer Chromatography
IU	International Units

i.v.	intravenös
IVC	Isolated ventilated cages
kBq	Kilobecquerel
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
KGW	Körpergewicht
LD ₅₀	Letale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben
LET	Linearer Energietransfer
MAk	Monoklonaler Antikörper
MBq	Megabecquerel
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mMol	Millimol
MW	Mittelwert
NEAS	Nicht essentielle Aminosäuren
nM	Nanomolar
p.i.	post injectionem
p.op.	post operationem
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
RIK	Radioimmunkonjugat
RIT	Radioimmuntherapie
ROI	Region of interest
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rotation per minute)
s.c.	subcutan
SCN-CHX-A''-DTPA	(2-(4-isothiocyanatobenzyl)-Cyclohexyl-Diethylen- triaminpentaessigsäure)
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
TUR	Transurethrale Resektion

1 EINLEITUNG

Maligne Tumoren stehen in den Industrienationen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen an zweiter Stelle der Todesursachen. Das Harnblasenkarzinom gilt als der zweithäufigste urologische Tumor nach dem Prostatakarzinom und ist in Europa für 3,5% aller Krebstodesfälle verantwortlich. Es stellt 2% aller malignen Tumoren dar und ist der vierthäufigste Tumor beim Mann sowie der achthäufigste Tumor bei der Frau. In Deutschland erkrankten jährlich ca. 25.000 Patienten neu am Harnblasenkarzinom (Stief et al., 2006). In den letzten 50 Jahren liess sich eine Zunahme der Fälle um 50% verzeichnen. Das Harnblasenkarzinom ist ein Tumor höheren Alters; das mittlere Alter der betroffenen Patienten bei Erstdiagnose liegt zwischen 65 und 70 Jahre, wobei Männer 3-mal häufiger betroffen sind als Frauen. Schätzungen für das Jahr 2002 beziffern die altersstandardisierte Harnblasenkarzinom-Inzidenz in Deutschland auf 38,5/100 000 für Männer und auf 10,5/100 000 für Frauen (GEKID, 2006).

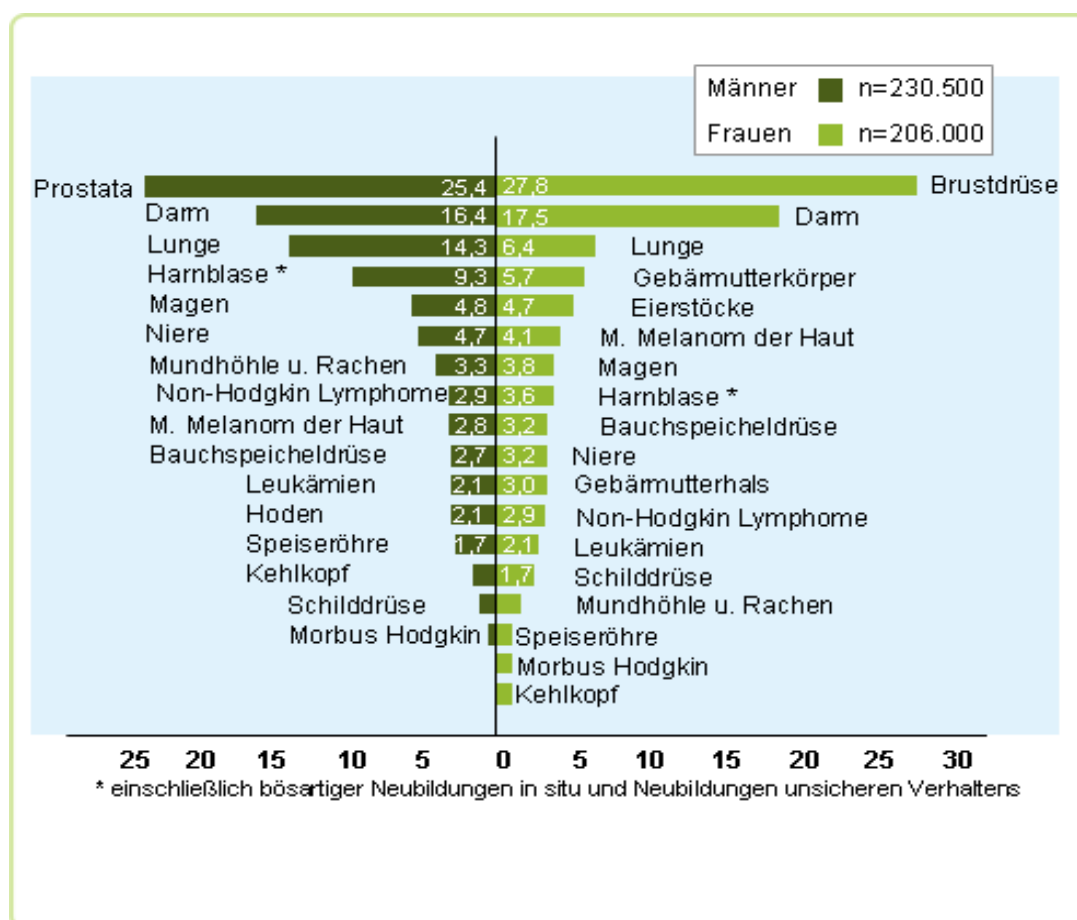


Abb. 1: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2004

(Quelle: Schätzung der Dachdokumentation Krebs im Robert Koch-Institut)

Pathogenetisch sind 95% der Harnblasenkarzinome Urothelkarzinome. 80% dieser Karzinome sind bei Erstdiagnose nichtinvasiv, 10-15% entwickeln im weiteren Verlauf ein muskelinvasives Wachstum (Vom Dorp et al., 2007). Nach der neuen WHO-Klassifikation wird das nicht muskelinvasive Urothelkarzinom anhand des histologischen Bildes und immunhistochemischer Analysen in einen „low-grade“- beziehungsweise „high-grade“-Tumor unterteilt.

Die Standard-Therapie von nicht muskelinvasiven „high grade“ Blasenkarzinomen umfasst die transurethrale Resektion (TUR) des Tumors verbunden mit adjuvanter Mitomycin C- oder BCG-Instillationstherapie, um das erneute Anhaften freier Tumorzellen an die entstandenen Läsionen zu verhindern. Dennoch entwickeln bis zu 40% der Patienten innerhalb von 5 Jahren Rezidive, daher ist die Entwicklung neuer adjuvanter Therapiestrategien nach TUR von besonderer Bedeutung.

Eine viel versprechende Therapieoption ist die lokoregionale Applikation von Radionuklid-Immunkonjugaten. Dazu werden geeignete Radionuklide mittels Chelator an Antikörper gekoppelt, welche selektiv an tumorassoziierte Antigene binden. Zur Abtötung von Einzelzellen eignen sich vor allem α -Strahler. Aufgrund der geringen Reichweite im Gewebe von 50-90 μm und einem hohen linearen Energietransfer von ca. 60-150 keV/ μm töten α -Emitter wie ^{213}Bi , ^{211}At und ^{225}Ac Tumorzellen sehr effizient ab, während umliegendes Gewebe geschont bleibt. Da 86% der Harnblasenkarzinome den EGF-Rezeptor (EGFR) überexprimieren (Cheng et al., 2002; Bellmunt et al., 2003; Rotterud et al., 2005), bietet sich ein anti-EGFR-Antikörper als Träger für das Radionuklid an. In dieser Studie stellt der EGFR ungeachtet seiner Beteiligung an karzinogenetischen Prozessen wie der Zellproliferation, Verhinderung der Apoptose, Angiogenese, Zellmotilität und Metastasierung (Vallbohmer und Lenz, 2005) aufgrund seiner Überexpression auf Blasenkarzinomen ein viel versprechendes Target für neue, zielgerichtete Therapieoptionen dar.

1.1 Zielsetzung

Die unbefriedigenden Ergebnisse in der Therapie des Urothelkarzinoms nach transurethraler Resektion (TUR) erfordern die dringende Suche nach neuen Strategien zur Abtötung frei flotierender Tumorzellen nach TUR zur Verhinderung von Tumorrezidiven. Bis zu 86% der Blasenkarzinome zeigen eine Überexpression des EGF-Rezeptors. Dieses Molekül stellt somit ein vielversprechendes Target für die zielgerichtete lokoregionale Radioimmuntherapie dar. Da auch die Oberflächenmoleküle EpCAM (Brunner et al., 2008) und MUC-1 (Hughes et al, 2000; Murray et al., 2001) auf Urothelkarzinomen überexprimiert werden, sollte in der vorliegenden Studie zunächst die Bindung entsprechender ^{213}Bi -markierter Antikörper mit der Bindung eines ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk an unterschiedliche Blasenkarzinomzelllinien verglichen werden. Die Zelllinie mit der höchsten Bindung sollte anschliessend als orthotopes transurethrales Xenotransplantat in einem Nacktmausmodell etabliert werden. Da es sich bei der Harnblase um eine räumlich eng begrenzte Körperhöhle handelt, bietet sich für die lokoregionale Therapie der an einen anti-EGFR-MAk gekoppelte, hoch zytotoxische α -Strahler ^{213}Bi mit einer sehr kurzen Reichweite von 50-90 μm für die Radioimmuntherapie disseminierter Tumorzellen an.

In einer präklinischen Studie am Mausmodell sollte die therapeutische Effizienz des ^{213}Bi -Radioimmunkonjugats nach intravesikaler Instillation im Vergleich zur intravesikalen Chemotherapie mit Mitomycin C, unter besonderer Berücksichtigung der Organtoxizität, evaluiert werden. Die Überlebenszeit der Tiere nach lokoregionaler Therapie diene hierbei als Referenz und sollte mit dem Überleben einer untherapierten Kontrollgruppe verglichen werden. Wachstum und Regression des xenotransplantierten Tumors sollten mit verschiedenen bildgebenden Verfahren wie Sonographie, ^{11}C -Cholin-PET und Biolumineszenz Imaging kontrolliert werden. Dabei galt es, das effizienteste und für die Tiere am wenigsten belastende Verfahren zu ermitteln. Außerdem sollten die xenotransplantierten Harnblasenkarzinomzellen nach Sektion der Tiere immunhistologisch angefärbt und somit in der murinen Blase nachgewiesen werden.

„Es ist nicht genug, zu wissen, man muss auch anwenden; es ist nicht genug, zu wollen, man muss auch tun.“

Johann Wolfgang von Goethe

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Das Harnblasenkarzinom

In Europa gehen 3,5% aller tumorbedingten Todesfälle auf das Harnblasenkarzinom zurück. Schon Anfang des letzten Jahrhunderts wurde der Nachweis geführt, dass aromatische Amine Blasenkarzinome induzieren. Die Latenzzeit zwischen der Einwirkung des Karzinogens und der Tumorentstehung beträgt im Allgemeinen 10 bis 40 Jahre (Liedl et al., 2003). Die Metabolisierung der aromatischen Amine erfolgt in der Leber, ihre Ausscheidung über den Urin. Über die N-Acetyltransferase werden die aromatischen Amine inaktiviert, so dass Langsam-Acetylierer ein erhöhtes Tumorrisiko haben. Bei beruflich erhöhter Exposition mit aromatischen Aminen in Betrieben wie z. B. der Textil-, Leder- und Farbstoffindustrie gilt das Harnblasenkarzinom als Berufskrankheit nach Nr. 1301 der Berufskrankheitenverordnung (Benson und Olsson, 2002).

Zu den wichtigsten Blasenkarzinogenen des Menschen zählen vor allem Nikotin, chemische Farbstoffe wie Benzidin und Anilin, verschiedene pharmakologische Wirkstoffe wie Phenacetin und Cyclophosphamid und chronische Harnwegsinfekte. Als begünstigender Risikofaktor gilt vor allem das Rauchen: Etwa 50 - 80% der Blasenkarzinome scheinen durch Nikotinkonsum verursacht (Liedl et al., 2003). Auch wenn die in zahlreichen Studien ermittelten Harnblasenkarzinomrisiken schwanken, bleibt unbestritten, dass starke Raucher ein höheres Risiko tragen als Nichtraucher (Brennan et al., 2000). So zeigt die Analyse von 11 Fall-Kontroll-Studien bei Männern, dass deren Risiko von 1,2-fach (1 - 4 Raucherjahre) bis auf 6,1-fach (mehr als 60 Raucherjahre) ansteigt. Die Aufgabe des Rauchens führt unmittelbar zu einer Reduktion des Karzinomrisikos (Golka et al., 2007).

Desweiteren sind gewisse Chemotherapeutika und Medikamente sowie frühere Bestrahlungen im kleinen Becken als Karzinogene bedeutsam. Besonders der analgetische Wirkstoff Phenacetin führt neben der interstitiellen Nephritis vor allem im oberen Harntrakt zur Entstehung von Urothelkarzinomen. Auch chronische Harnwegsinfekte begünstigen die Bildung eines Harnblasenkarzinoms, so dass es

insbesondere bei jahrelangen Dauerkatheterträgern zu einer Ausbildung von Plattenepithelkarzinomen kommen kann. Im Rahmen der chronischen Harnwegsinfektion kann die Bilharziose (eine Infektion mit dem Pärchenegel *Schistosoma haematobium*), wie sie in weiten Teilen Afrikas endemisch vorkommt, zur Entstehung von Plattenepithelkarzinomen führen. Ursächlich wird eine infektionsbedingte Nitrosaminbildung vermutet (Liedl et al., 2003). Ob ausserdem eine erbliche Komponente eine Rolle bei der Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms besteht, ist bislang nicht eindeutig geklärt.

In der EU erkranken jährlich 116.000 Menschen am Harnblasenkarzinom; ungefähr 36.500 versterben daran (Boyle und Ferlay, 2005). Weltweit treten pro Jahr 357.000 Neuerkrankungen mit steigender Inzidenz und 145.000 Todesfälle auf (Parkin et al., 2005). Es wird davon ausgegangen, dass 50 % der durch ein Harnblasenkarzinom verursachten Todesfälle bei Männern und 25 % bei Frauen, in Deutschland insgesamt circa 2.700 Fälle pro Jahr, vermeidbar sind (Becker und Wahrendorf, 1997).

2.1.1 Klassifikation des humanen Harnblasenkarzinoms

Die aktuelle WHO-Klassifikation von 2004 bewertet deutlich besser die Risikoprofile unter histopathologischen Gesichtspunkten. So unterscheidet sie zwischen genetisch stabilen Tumoren wie den papillären urothelialen Neoplasien mit niedrig maligner Potenz (PUNLMP), den nichtinvasiven Low-grade-Urothelkarzinomen und den genetisch instabilen Tumoren wie z.B. den nichtinvasiven High-grade-Karzinomen (auch das Carcinoma in situ) und den invasiven High-grade-Urothelkarzinomen. Diese neue Klassifikation wird ergänzend zu der WHO-Klassifikation von 1973 verwendet (Seitz et al., 2005).

80% der Harnblasenkarzinome erweisen sich bei Diagnosestellung als nicht invasiv, d.h. die Tumoren beschränken sich auf das Urothel (T_a , Carcinoma in situ (CIS)), bzw. die angrenzende Lamina propria (T_1) (Abb. 2). Invasive Blasentumoren zeigen

darüber hinaus eine Infiltration der Muscularis (T_{2a} , T_{2b}), des Fettgewebes (T_{3a} , T_{3b}) bzw. der Nachbarorgane (T_4) (Mostofi WHO-Klassifikation 1999).

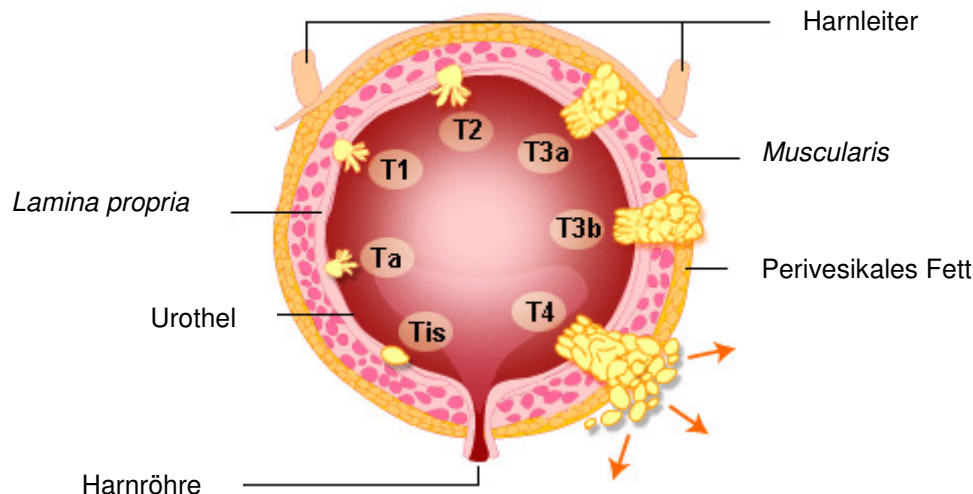


Abb. 2: Ausbreitung des Urothelkarzinoms innerhalb der Harnblase und deren Klassifikation entsprechend der Infiltrationstiefe. Tis – *carcinoma in situ*; Ta – nichtinvasiver papillärer Tumor; T1 – Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe; T2 – Tumor infiltriert Muskulatur; T3 – Tumor infiltriert perivesikales Gewebe (T3a – mikroskopisch, T3b – makroskopisch); T4 – Tumor infiltriert benachbarte Organe (z.B. Prostata, Uterus, Vagina, Becken- und Bauchwand). (Darstellung modifiziert nach <http://www.withe.ne.jp-urologycancer005.htm>)

Sowohl die Wahl einer geeigneten Therapie als auch der Erfolg der angewandten Therapie sind abhängig vom Tumorstadium und der genetischen Stabilität der Tumoren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

2.1.2 Stand der Therapie

Die Standardbehandlung für muskelinvasive (T_2 , T_3 , T_4) Harnblasenkarzinome mit kurativer Intention ist die radikale Zystektomie bzw. die Radiochemotherapie (Weiss et al., 2006). Nicht invasive Blasentumoren werden mittels transurethraler Resektion (TUR) mittels Elektroschlinge oder Laserung therapiert (Stief et al., 2006).

Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit nicht invasiven „low-grade“ Tumoren liegt nach transurethraler Resektion zwischen 81% und 96% (Vom Dorp et al., 2007).

Nicht invasive „high-grade“ Tumoren stellen dagegen eine größere Herausforderung im Hinblick auf eine erfolgreiche Therapie dar. Nach transurethraler Resektion beträgt das Risiko für ein Rezidiv nahezu 80% und das Risiko für die Entwicklung eines muskelinvasiven Stadiums 50 - 65% (Soloway et al., 2002). Eine adjuvante, intravesikale Instillationstherapie kann hier einen wichtigen Beitrag zur Senkung der Rezidiv- und Progressionsrate leisten. Das Rezidivrisiko nach transurethraler Resektion kann sowohl mit intravesikaler Immuntherapie (Bacillus Calmette-Guérin, BCG) als auch mit Chemotherapie um ca. 30% gesenkt werden (Smith et al., 1999). Aufgrund geringerer Nebenwirkungen wird die intravesikale Chemotherapie (u.a. mit Paclitaxel, Thiotepa, Epirubicin, Valrubicin, Gemcitabine, Doxorubicin, Mitomycin C) als adjuvante Therapie nach transurethraler Resektion favorisiert (Amling, 2001). Als Standardtherapie zur Rezidivprophylaxe nach transurethraler Resektion von nichtinvasiven Blasentumoren wird Mitomycin C (40 mg) in 40 ml physiologischer NaCl-Lösung für 2 - 3 h intravesikal instilliert. Bei sofortiger, postoperativer Instillation lässt sich damit das Rezidivrisiko um bis zu 39% senken (Sylvester et al., 2004). Trotzdem kommt es, abgesehen von den Nebenwirkungen einer Chemotherapie, bei 15 - 40% der Patienten innerhalb von 5 Jahren zum Tumorrezidiv.

Die intravesikale Immuntherapie mit BCG verursacht bei über 26% der Patienten schwerwiegende Nebenwirkungen wie Zystitis, Hämaturie, grippale Symptome und Sepsis, die schließlich bei 10% der Patienten zum Abbruch der Therapie führen. Angewendet wird die BCG-Instillation meist bei Therapieversagen der weniger nebenwirkungsreichen Chemotherapie und ist Standardtherapie des Carcinoma in situ. Hier bleibt beim Versagen derzeit nur die radikale Zystektomie als kurative Therapie übrig (Gontero und Freja, 2006).

Die Radioimmuntherapie mit α -emittierenden Nukliden zeigt neue Perspektiven in der Rezidivprophylaxe nach transurethraler Resektion. Besonders die lokoregionale Applikation von α -Emitter-Immunkonjugaten in präformierte Körperhöhlen wie der Blase ist eine viel versprechende Therapieoption (Couturier et al., 2005; Cherel et al., 2006).

2.1.3 Der EGF-Rezeptor und spezifische anti-EGFR-Antikörper für die Therapie des Harnblasenkarzinoms

Der EGF-Rezeptor (EGFR) stellt aufgrund seiner hohen Expression auf Urothelkarzinomen ein viel versprechendes Target für neue Therapieoptionen dar. Die Dichte der Expression des EGFR korreliert eng mit dem Stadium der Tumorausdehnung, seiner Malignität und der Tumorprognose (Messing, 1990; Neal et al., 1990; Mellon et al., 1995; Bellmunt 2003). Die EGFR Aktivierung durch den Wachstumsfaktor EGF fördert das Tumorwachstum durch Erhöhung der Zellproliferation, Motilität und invasiven Kapazität sowie die Blockierung von Apoptose (Harari, 2004; Vallbohmer und Lenz, 2005). Nach Behandlung von Xenotransplantaten des humanen Blasenkarzinoms mit dem anti-EGFR-Antikörper IMC-225 (Cetuximab) wurde eine Inhibierung des Tumorwachstums beobachtet (Bellmunt et al., 2003). Der humanisierte anti-EGFR-Antikörper EMD 72000 (Matuzumab) bindet mit einer höheren Affinität als die natürlichen Liganden des EGF-Rezeptors, EGF und TGF- β , und inhibiert somit die Zellproliferation (Seiden et al., 2007). EMD 72000 wurde in zahlreichen klinischen Phase 1 und Phase 2 Studien in Patienten mit squamösem Zellkarzinom des Larynx und des Hypopharynx (Bier et al., 2001), kleinzelligem Bronchialkarzinom (Kollmannsberger et al., 2006) bzw. Ovarialkarzinom mit Peritonealkarzinose und fortgeschrittenem Zervikalkarzinom (Seiden et al., 2007, Schiller, 2007) erfolgreich eingesetzt.

Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGF-Rezeptor) ist ein 170 kD schweres transmembranes Glykoprotein mit einer extrazellulären Ligandenbindungsstelle, einem lipophilen transmembranalen Abschnitt und einer zytoplasmatischen Domäne, die eine Phospho-Tyrosin-Kinase-Aktivität besitzt (Ullrich et al. 1984). Der EGF-Rezeptor steht an der Spitze einer komplexen Signalkette, die die Zellvermehrung, das Überleben sowie die Zelladhäsion, -migration und -differenzierung steuert. Extrazelluläre Ligandenbindung bewirkt durch Konformationsänderung die Stimulation der zytosolisch lokalisierten Tyrosinkinase-Aktivität, was zur Autoaktivierung und Phosphorylierung von Tyrosin-Resten außerhalb des aktiven Zentrums führt. Der Rezeptor wird durch die zellulären Proto-Onkogene c-erb und c-fms kodiert und ist in den meisten Zelltypen vorhanden.

Liganden des EGF-Rezeptors sind der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und der transformierende Wachstumsfaktor α (TGF α).

Der humane EGF hat eine Sequenz von 53 Aminosäuren (Gregory 1975) ohne Phenylalanin, Lysin und Alanin, aber mit sechs Cysteinresten, die durch drei Disulfidbrücken verbunden sind. Sein Molekulargewicht beträgt 6045 Dalton. Der humane und der Maus-EGF bestehen beide aus der gleichen Anzahl Aminosäuren, von denen 37 homolog sind. Der EGF, der in nahezu allen Körperflüssigkeiten vorkommt, wird von Niere und Speicheldrüse synthetisiert und wirkt über einen endokrinen Weg. TGF α wird sowohl von physiologischen als auch von malignen Zellen produziert und entfaltet seine Wirkung auf parakrinem, autokrinem und juxtakrinem Weg. Unter physiologischen Bedingungen spielt der EGFR eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung, bei der Zellproliferation und Differenzierung. Durch Expression mutierter Rezeptoren, durch eine Überproduktion der EGFR-spezifischen Liganden oder durch Überexpression des Rezeptors selbst sind ausreichend Möglichkeiten gegeben, um an der Kanzerogenese beteiligt zu sein. In Abwesenheit von Liganden sind die Rezeptoren homogen auf fast allen Körperzellen vorhanden.

EGF-Rezeptoren sind an der Entstehung und dem Fortschreiten vieler häufig vorkommender Krebserkrankungen beteiligt. Eine im Zusammenhang mit der Krebsentstehung wichtigere Kaskade, die durch den EGF-Rezeptor aktiviert wird, beinhaltet das membrangebundene ras-Protein. Ihm wird eine Schlüsselrolle in der Mitogenese zugeschrieben (Bokoch und Der 1993). Das ras-Protein aktiviert Raf bzw. dient ihm als membranärer Anker (Leevers et al. 1994). Raf 1 ist eine Serin-Threonin-Kinase, die weitere Kinasen aktiviert, welche die Induktion zahlreicher Wachstumsfaktoren bewirken.

Epitheliale maligne Tumoren überexprimieren den EGF-Rezeptor, was mit dem Stadium des Tumors und der Differenzierung der Tumorzellen korreliert (Chow et al., 1997). Die Überexpression des EGF-Rezeptors ist in menschlichen Tumoren häufig zu beobachten, so auch im humanem Harnblasenkarzinom (Cheng et al. 2002). Wird verhindert, dass der EGFR ein Signal auslöst, trägt dies auf verschiedenen Wegen zur Verhinderung des Tumorwachstums bei.

Mittels monoklonaler Antikörper, die spezifisch und mit hoher Affinität an eine extrazelluläre Domäne des Rezeptors binden, kann dessen Aktivierung blockiert werden.

Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper EMD 72000 ist ein von der Firma Merck produzierter humanisierter muriner monoklonaler Antikörper der Immunklasse IgG1 gegen den EGF- Rezeptor, der bereits in klinischen Studien der Phase II eingesetzt wird und - in einer Dosierung von bis zu 1.200 mg verabreicht - den EGF-Rezeptor blockieren und somit das Tumorwachstum hemmen soll. Bei humanisierten AK ist die murine Antigenbindungsstelle an einen humanen AK gekoppelt (Buchsbaum, 1997) Studien am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York haben gezeigt, dass humanisierte AK sogar eine höhere Affinität aufweisen als ihre murinen Vorgänger (Co et al., 1992; Caron et al., 1992). EMD 72000 enthält weniger als 5 % muriner Bestandteile, bewahrt seine hohe Affinität für humanes EGFR und zeigt keine Reaktion mit murinem EGFR (Kettleborough et al., 1991).

In dieser Studie wird der EGF-Rezeptor aufgrund seiner erhöhten Expression auf Tumorgewebe ungeachtet seiner Beteiligung an karzinogenen Prozessen ausschliesslich als Zielstruktur für die Radioimmuntherapie verwendet. Eine intravesikale Instillation eines Anti-EGFR-MAk gekoppelt an den hoch zytotoxischen α -Emitter ^{213}Bi zur adjuvanten Therapie des Blasenkarzinoms, d. h. zur Abtötung frei flotierender Tumorzellen nach transurethraler Resektion, verspricht daher eine hohe therapeutische Effizienz und scheint auch insbesondere für die Therapie des nur wenige Zellschichten tiefen Carcinoma in situ ideal geeignet.

2.2 Radioimmuntherapie von Tumoren

2.2.1 Prinzip der Radioimmuntherapie

Anders als bei der Chemotherapie, die unspezifisch alle sich in Teilung befindenden Zellen schädigt, werden in der Radioimmuntherapie Trägermoleküle (Antikörper, Peptide) verwendet, die Strukturen auf Tumorzellen erkennen und selektiv an diese

binden. Durch die Kopplung eines Radionuklids an einen tumorspezifischen Antikörper wird eine wirksame Strahlendosis gezielt im Tumor deponiert.

Die Reichweite der eingesetzten α - und β -Strahlung ist mit 3-4 Zelldurchmessern (α -Strahler) und 45 Zelldurchmessern (β -Strahler) sehr gering und verhindert so im Idealfall eine Strahlenschädigung des benachbarten gesunden Gewebes. Erste klinische Ergebnisse belegen diese Wirkungen und zeigen ihr großes Potential als hochwirksame und gleichzeitig schonende Tumorthérapien. Die Idee, sich bei dieser Art der Tumorbehandlung der Spezifität von Antigen-Antikörperbindungen zu bedienen, ist nicht neu. 1906 postulierte Paul Ehrlich die Vielfalt der sogenannten „Magic Bullets“, wonach definierte Zielstrukturen einer Zelle als spezifische Bindungsstelle für die Träger zytotoxischer Substanzen dienen: *„Such substances...would represent...magic bullets which seek their target of their own accord.“* (Paul Ehrlich, 1906).

Ziel der Tumorthérapie mit Radioimmunkonjugaten ist, im Tumorgewebe eine hohe Strahlendosis zu erreichen und die malignen Zellen dadurch abzutöten. Dazu werden Proteine, wie z.B. Rezeptoren, an der Oberfläche von Tumorzellen genutzt, die im Vergleich zu gesundem Gewebe vermehrt oder sogar ausschliesslich (tumorspezifisch) exprimiert werden. Genau gegen diese Struktur wird dann ein Trägermolekül, ein monoklonaler Antikörper, hergestellt. Die Bildung monoklonaler Antikörper durch Zellfusion von Lymphozyten mit Krebszellen wurde 1975 durch Köhler und Milstein entdeckt: *„...such (hybrid) cells can be grown in vitro in massive cultures to provide specific antibody. Such cultures could be valuable for medical and industrial use.“* (Köhler und Milstein, 1975). Seither stellt die Herstellung monoklonaler Antikörper die am schnellsten wachsende Produktionssparte der Biopharmazie dar. Mit Hilfe eines chemischen Zwischenmoleküls (Chelator) werden metallische Radionuklide an den Antikörper gekoppelt und mit dem Grundprinzip des „Targeting“ deren Energie am Zielort freigesetzt.

2.2.2 Monoklonale Antikörper als Träger des Radionuklids

Zur Behandlung proliferativer Erkrankungen werden monoklonale Antikörper (MAK) als Träger zytotoxischer Substanzen eingesetzt. Antikörper sind Eiweissmoleküle, die körperfremde und ggf. auch körpereigene Strukturen (Antigene) erkennen und an diese binden. Dies ist von Bedeutung bei der Immunabwehr gegen Krankheitserreger. Gebildet werden die Antikörper von hochspezialisierten B-Lymphozyten, jede dieser Zellen produziert einen Antikörper, der ein ganz bestimmtes Merkmal erkennt. So wird die Erkennung jeder fremden Struktur, wie z.B. eindringende Mikroorganismen, ermöglicht. Um die Funktion von Antikörpern für die Tumordiagnostik und –therapie zu nutzen, wurden in den letzten Jahren einheitliche Antikörper mit klar definierten Angriffszielen, die sogenannten monoklonalen Antikörper, produziert. Mit der Hybridoma-Technik können MAK mit stets gleich hoher Spezifität und Affinität zum Antigen in grosser Menge hergestellt werden (Köhler und Milstein, 1975). Die Hybridoma-Technik beruht auf der Verschmelzung von Antikörper-produzierenden B-Zellen mit Zellen einer Myelom-Zelllinie, wodurch hybride Zellen entstehen, die unbegrenzt Antikörper einer bestimmten Spezifität produzieren. Um Antikörper gegen ein definiertes Antigen zu erhalten, werden Mäuse mit dem entsprechenden Antigen immunisiert und die B-Lymphozyten aus Milz, Lymphknoten oder peripherem Blut mit Myelomzellen fusioniert. Die so entstandenen Hybridome produzieren jeweils nur einen Antikörper bestimmter Spezifität.

Monoklonale AK binden im Allgemeinen an tumorassoziierte Antigene, also an Strukturen, die nur von Tumorzellen, jedoch nicht oder nur in weit geringerem Ausmaß von Zellen des Normalgewebes exprimiert werden. Das hat den wesentlichen Vorteil, dass bei maximalem therapeutischem Erfolg die zytotoxische Wirkung auf gesunde Zellen auf ein Minimum begrenzt wird. Bedingt durch die kurze Reichweite der α -Strahlung kann der sogenannte „Kreuzfeuer-Effekt“ bei α -Emittern vernachlässigt werden, d.h., Zellen, an die α -Emitter-Konjugate nicht binden, werden im Allgemeinen auch nicht durch diese geschädigt. Der „Kreuzfeuer-Effekt“ ermöglicht die Bestrahlung benachbarter Zellen innerhalb eines Tumorzellverbandes, die z.B. Antigen-negativ sind, oder zu denen der MAK nicht vordringen konnte.

Die Verabreichung der RIK erfolgt über den Blutweg oder aber lokoregional (intraperitoneal, intratumoral oder intravesikal) zur schnelleren Bindung an das Zielantigen und zur wesentlichen Reduktion der Ganzkörperexposition.

In der Radioimmuntherapie bedeutet die spezifische Bindung von dem in dieser Arbeit eingesetzten anti-EGFR-MAk, ungeachtet der Blockade des EGF-Rezeptors und somit der Blockierung der Signalkaskade, die das Wachstum der Zelle induziert (Zafir-Lavie et al., 2007), ausschliesslich die zielgerichtete Abgabe des zytotoxischen Agens, in diesem Fall die α -Strahlung, unmittelbar am Wirkort (Tortora et al., 2007).

2.2.3 α - und β -Strahler für die Radioimmuntherapie

α -Strahlung ist ionisierende Strahlung, die beim radioaktiven Zerfall (Alphazerfall) auftritt. Dabei werden Heliumkerne freigesetzt, bestehend aus zwei Protonen und zwei Neutronen. Ein radioaktives Nuklid, das diese Teilchenstrahlung aussendet, wird als Alphastrahler bezeichnet. Die Austrittsgeschwindigkeit der Teilchen aus dem Kern liegt zwischen 15.000 und 20.000 km/s. Aufgrund der hohen Masse und wegen der starken Wechselwirkung mit der Materie, kann Alphastrahlung leicht abgeschirmt werden. Wirkt sie von aussen auf den Körper ein, ist sie relativ ungefährlich, da die Alphateilchen auf Grund ihrer geringen Eindringtiefe überwiegend nur in die oberen, toten Hautschichten eindringen. Ein im Organismus durch Einatmen oder Aufnahme mit der Nahrung eingelagerter (inkorporierter) Alphastrahler ist dagegen sehr schädlich, da in diesem Fall nicht die toten Hautschichten, sondern lebende Zellen geschädigt werden. Durch die geringe Reichweite im Gewebe von 50-90 μm und einem hohem linearen Energietransfer töten α -Emitter, wie ^{213}Bi , ^{211}At , ^{225}Ac , ^{212}Pb und ^{212}Bi , Tumorzellen unter Schonung des benachbarten Gewebes wirkungsvoll ab. Bedingt durch diese kurze Reichweite ist die Anwendung von α -Emittern zur Abtötung von einzelnen, disseminierten Tumorzellen, bzw. okkulten oberflächlichen Tumorzellclustern sehr gut geeignet. β -Emitter weisen dagegen eine höhere Reichweite von 0,6 - 4mm auf und sind daher eher für die Eliminierung von Tumorzellen in grösseren Zellverbänden geeignet, bergen jedoch auch die Gefahr der Schädigung benachbarter gesunder Zellen.

Da die Alphastrahlung nur eine sehr geringe Reichweite hat, erfolgt die Energieabgabe auf kürzester Strecke von 50-90 μm . Diese Strecke entspricht ca. 3-4 Zelldurchmessern. Der lineare Energie-Transfer (LET) von Alphastrahlern, also die pro Wegstrecke abgegebene Energie, beträgt ca. 60-150 keV/ μm Gewebe und ist somit erheblich höher als z. B. der des Betastrahlers Yttrium-90 (0,2 keV/ μm Gewebe). Da die gesamte Energie also auf kleinster Wegstrecke abgegeben wird, bewirkt die hohe Ionisationsdichte eine besonders hohe Zytotoxizität aus. Durch die dicht ionisierende Strahlung werden mehr irreparable DNA-Doppelstrangbrüche verursacht als bei locker ionisierender Strahlung (Couturier et al., 2005).

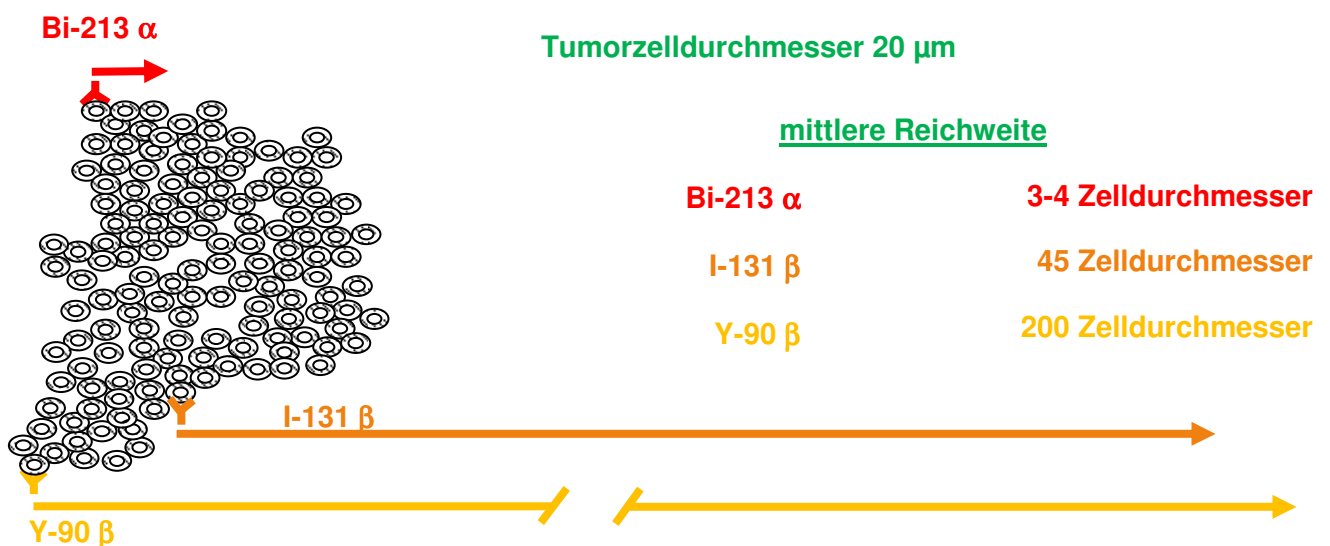


Abb. 3: Reichweite von α - und β -Teilchen

Für den gleichen zytotoxischen Effekt auf kleinere Tumorzellaggregate oder disseminierte Tumorzellen, der durch den hohen LET der Alphastrahlung erreicht wird, würde man eine weit höhere Zahl an gekoppelten Beta-Molekülen an einer einzelnen Zelle benötigen. Deren Reichweite (0,6 – 4mm) ist um zwei Zehnerpotenzen höher als der Durchmesser der eigentlichen Zielzelle. Das hat zur Folge, dass Zellen des Normalgewebes durch die höhere Reichweite der β -Strahlung über das eigentliche Ziel hinaus ebenso geschädigt werden. Die Grösse des Tumors

ist daher ein wichtiges Kriterium bei der Auswahl des Radionuklids. So kann das Überleben von Lymphomzellen mit 3 – 5 α -Teilchen, die den Zellkern treffen, auf 10% reduziert werden (Macklis et al., 1992). Um den gleichen Effekt zu erzielen, müssten ca. 1200 β -Partikel den Zellkern treffen (Humm 1987).

α -Emitter-Immunkonjugate wurden im Tiermodell bisher zur Therapie von Leukämie (Bethge et al., 2006), des Ovarialkarzinoms (Elgqvist et al., 2006), des Melanoms (Rizvi et al., 2005), des Magenkarzinoms (Beck et al., 2007), sowie von Mamma-, Prostata- und Pankreaskarzinom (Ballangrud et al., 2004; McDevitt et al., 2000; Qu et al., 2005) verwendet. Aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit des α -Emitters ^{213}Bi von 45,6 min eignet sich dieses Nuklid vor allem für den lokoregionalen Einsatz, bei dem das therapeutische Agens in unmittelbarer Nähe zu den Zielzellen appliziert wird. Mit Hilfe eines ^{213}Bi -gekoppelten tumorspezifischen Antikörpers gegen mutiertes E-Cadherin auf diffusen Magenkarzinomzellen konnten sowohl in vitro als auch nach lokoregionaler Applikation im Tiermodell mit i.p. inokulierten Tumorzellen diese sehr effizient abgetötet werden (Huber et al., 2003; Bloechl et al., 2005; Seidl et al., 2005; Beck et al., 2007; Buchhorn et al., 2007). In älteren Studien an Blasenkarzinomen kamen auch β -Emitter zum Einsatz – so zeigten ^{67}Cu - und ^{188}Re -gekoppelte Anti-MUC1-Mucin Antikörper eine gute Anreicherung in Blasentumoren, wurden aber bislang therapeutisch nicht eingesetzt (Hughes et al., 2000; Murray et al., 2001).

In einem Lungenmetastasenmodell an Mäusen wurde die Wirkung des β -Strahlers Yttrium-90 mit der des α -Emitters ^{213}Bi verglichen: Beide Radionuklide wurden an den gleichen AK gekoppelt und i.v. injiziert. Es zeigte sich der gleiche therapeutische Erfolg beider Radionuklide bei Metastasen bis zu einer Grösse von 2000 Zellen, bei grösseren Metastasen erwies sich ^{90}Y gegenüber dem α -Strahler ^{213}Bi im Therapieergebnis als überlegen. Jedoch mussten die mit ^{90}Y behandelten Tiere abhängig von der applizierten Aktivität innerhalb von 20 Tagen aufgrund ihrer Lungenhämorrhagien euthanasiert werden, oder zeigten 60 Tage post injectionem Langzeitschäden in Form von Lungenfibrosen (Kennel et al., 1999a).

In klinischen Phase I Studien wurden α -Emitter-Immunkonjugate bisher zur Therapie von Akuter Myeloischer Leukämie (AML), des Melanoms, des Ovarialkarzinoms

sowie des Glioblastoms Grad IV eingesetzt (Jurcic 2005; Raja et al., 2007; Hultborn et al., 2007; Zalutsky und Pozzi, 2004).

Der Grund für den vorwiegenden Einsatz von Betastrahlern in der Radioimmuntherapie lag in der besseren Verfügbarkeit dieser Nuklide im Vergleich zu α -Emittern. Die meisten der über 100 vorkommenden Alphastrahler schliessen sich aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften (zu hohe HWZ, Tochternuklide innerhalb der Zerfallsreihe, hoher Aufwand an Personenschutz), deren chemischen Eigenschaften (Aggregatzustand, Kopplung an die Trägermoleküle) sowie deren Verfügbarkeit für die Anwendung in der Medizin (Gewinnung aus radioaktivem Material, Herstellung in Linearbeschleunigern) aus. Übrig bleiben unter Berücksichtigung der o.g. Punkte ^{225}Ac , ^{211}At und ^{213}Bi . ^{225}Ac hat den Nachteil einer langen HWZ von 10d bei gleichzeitigem Vorteil einer Emission von 4 α -Partikeln innerhalb der Zerfallsreihe, welcher jedoch aufgrund der hohen Rückstoßenergie bislang keine Chelatbindung standhält. Das hätte zur Folge, dass sich ^{225}Ac vom gebundenen AK ablösen würde. Der grosse Vorteil des ^{225}Ac liegt in seiner Eigenschaft als ^{213}Bi -Generator, mit dem man einen Weg gefunden hat, auf Basis einer ^{225}Ac -Quelle einen klinisch nutzbaren Alphastrahler ^{213}Bi mit einem Minimum an Aufwand und personeller Schutzvorrichtung zu eluieren.

2.2.4 α -Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi

Der verwendete Alphastrahler zur Radioimmuntherapie muss hinsichtlich chemischer und physikalischer Reinheit, ökonomischer Verfügbarkeit und einer HWZ, die einerseits lang genug ist, um das Kopplungsverfahren an den MAK und seine Bioverteilung zu ermöglichen und andererseits kurz genug um den Patienten keiner übermässigen Strahlung auszusetzen, ausgewählt werden. Diese Kriterien erfüllt ^{213}Bi mit seiner HWZ von 45,6 min, wobei aufgrund der verhältnismässig kurzen HWZ ein zügiger Kopplungsprozess nötig ist. Ein weiterer Vorteil liegt in der zeitnahen Gewinnung durch Eluierung aus dem ^{225}Ac -Generator. ^{225}Ac liegt im Generator an Harz gebunden vor und zerfällt über 6 Tochternuklide zu stabilem ^{209}Bi ,

dabei werden insgesamt 4 α -Partikel frei. Abb. 6 zeigt übersichtlich das Zerfallsschema von ^{225}Ac über ^{213}Bi zu ^{209}Bi . Durch neu entwickelte Trägerharze ist es möglich, radiochemisch reine ^{213}Bi -Eluate zu gewinnen (Mirzadeh und Kennel, 1996). Eine Gammastrahlung von 440 keV ermöglicht eine in-vivo-Szintigrafie und eine einfache Aktivitätsmessung, die nicht zuletzt auch von grosser Bedeutung im Strahlenschutz ist (Sgouros et al., 1996). Neuere Prozesse konnten das Eluierungsverfahren auf 10 min beschleunigen (Ma et al., 2001).

Bei dem Radionuklid ^{213}Bi handelt es sich also um einen α -Strahler, der wie alle α -Emitter über eine hohe relative biologische Wirksamkeit bezüglich der Induktion von Zelltod mit minimaler Toxizität auf benachbarte Zellen verfügt. Dieser Vorteil kann nach der Resektion eines Harnblasenkarzinoms genutzt werden, um disseminierte einzelne Tumorzellen zu vernichten und so Rezidiven vorzubeugen.

2.2.5 Bindung des ^{213}Bi an den Antikörper

Die Kopplung des zytotoxischen Radionuklid an den monoklonalen Antikörper soll dessen Pharmakokinetik und Bindung nicht beeinflussen und muss die Stabilität des RIK in vivo garantieren, welche die HWZ des eingesetzten Radionuklides um eine Mehrfaches übertreffen soll. Bei geringer in vivo-Stabilität wird der Transport des Radionuklids zur Zielstruktur nicht gewährleistet. Der Radionuklid-AK-Komplex bricht, ungebundenes ^{213}Bi diffundiert ab und akkumuliert in der Niere (Nikula et al., 1999). Die renale ^{213}Bi -Akkumulation nach Applikation von ^{213}Bi -Immunkonjugaten kann somit zur Bewertung der Bindungsstabilität des Radionuklid-Antikörper-Komplexes herangezogen werden. Den hohen Anforderungen an die Belastbarkeit eines solchen Komplexes wird der bifunktionelle Chelator SCN-CHX-A'-DTPA (2-(4-isothiocyanatobenzyl)-Cyclohexyl-Diethylentriaminpentaessigsäure) gerecht (Abb. 4). Zudem zeigte sich in einer Studie, dass CHX-A und -B Immunkonjugate eine niedrigere Anreicherung (%ID/g) in der Niere aufweisen als Konjugate mit anderen Chelaten (Milenic et al., 2001). In einem Vergleich von CHX-B-DTPA mit CHX-A-DTPA-Konjugaten stellte sich heraus, dass CHX-A-DTPA eine höhere Stabilität aufweist (Kobayashi et al., 1998).

Die Stabilität dieses DTPA-Konstruktes wird zwar von anderen Chelatoren wie zum Beispiel DOTA übertroffen (Camera et al, 1994), jedoch erfolgt die Chelatierung durch DOTA mit zufriedenstellenden Ausbeuten erst ab Temperaturen $>60^{\circ}\text{C}$. Dieses wäre mit einer zeitaufwändigen Markierungstechnik verbunden, die bei kurzlebigen Nukliden wie ^{213}Bi unvorteilhaft und auch für die temperatursensitiven Antikörper ungeeignet ist (Milenic et al., 2001).

Die DTPA-Stabilität ist bei der HWZ des ^{213}Bi von 45,6 min mit einem in vitro-Release von weniger als 5% über zwei Tage ausreichend (Nikula et al, 1999). Dass SCN-CHX-A''-DTPA weder Einfluss auf die Bindungskinetik (Fischer, 2001) noch auf die Biodistribution (Huneke et al, 1992) des jeweils markierten Antikörpers hat, ist bewiesen.

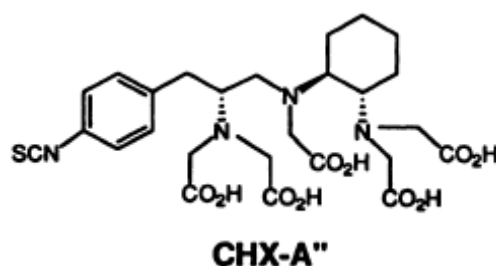


Abb. 4: Chemische Struktur des in dieser Arbeit verwendeten bifunktionellen Liganden (entnommen aus Kobayashi et al., 1998)

Der Kopplungsprozess der Radionuklide an den Antikörper ist bei Brechbiel und Gansow (1991) sowie bei Mirzadeh und Kennel (1996) ausführlich beschrieben. Bei Verwendung metallischer Nuklide wie z.B. ^{213}Bi besteht die Kopplung an Antikörper aus zwei Reaktionen. Eine Reaktion ist die kovalente Bindung des Chelates an den Antikörper und die andere Reaktion ist die Chelatierung des Radioisotops. Bei dem Markierungsvorgang werden die Chelate an die Antikörper gekoppelt und erst in einem späteren Schritt erfolgt die Kopplung des Isotops an die vorchelatierten Antikörper. Dadurch verkürzt sich die Zeit für den Markierungsprozess des Antikörpers und das Nuklid wird nur bei einer der zwei Reaktionen eingesetzt. Bei

einer weiteren Markierungstechnik wie z.B. bei der DOTA-Chelatierung, wird zunächst das Nuklid chelatiert und dann erst der Chelatkomplex an den Antikörper gebunden. Da ^{213}Bi eine geringe Halbwertszeit von 45,6 min besitzt, spielt ein zeitsparender Markierungsprozess bei der Herstellung der RIK eine grosse Rolle, so dass die Kopplung des Isotops an die bereits vorchelatierten Antikörper erfolgt. CHX-A-DTPA hat sich in vielen Arbeitsgruppen für die Chelatierung von Nukliden wie ^{111}In , ^{90}Y und ^{213}Bi bewährt. Der Vorteil der DTPA-Derivate liegt in der sehr schnellen Reaktionskinetik, so dass auch kurzlebige Isotope in wenigen Minuten mit Antikörpern konjugiert werden können.

2.2.6 Toxizität

In vitro

Das ideale zytotoxische Radionuklid ist jenes, dessen Reichweite der Strahlung sich nur auf die Tumorzelle beschränkt und das umliegende gesunde Gewebe schont. Der α -Strahler ^{213}Bi besitzt mit seiner kurzen Reichweite und seinem hohen linearen Energietransfer verbunden mit kurzer HWZ alle Eigenschaften, die für die Elimination einzelner Zellen oder kleinerer Zellcluster unter Schonung des umliegenden Gewebes nötig sind. Die toxische Wirkung des α -Radioimmunkonjugates ist einerseits abhängig von Grösse und Form der Zelle und des Zellkerns (Stinchcomb und Roeske, 1995) und andererseits von ihrer Expression des tumorspezifischen Antigens, in diesem Falle des EGFR. Da die Strahlungsenergie mit Hilfe der spezifischen Bindung des RIK lokal deponiert wird, ist die Wirkung abhängig von einer homogenen Antigenverteilung, einer entsprechend hohen Antigendichte (Goddu et al., 1994; Schmid et al., 1996) sowie der Zugänglichkeit der Antigene. So sind drei- bis sechsmal mehr Zerfälle des ^{213}Bi notwendig um die gleiche Anzahl von Zellen, die im Zellverbund als Monolayer vorliegen, zu töten, wie von gleichen Zellen, die in Sphäroidkultur vorliegen (Kennel et al., 1999b). In vitro konnte an einer humanen Mammakarzinom-Zelllinie (MDA) bei spezifischer Bindung eines ^{213}Bi -Immunkonjugates an Zellen, die als Monolayer vorlagen, eine LD_{50} bei einer Aktivitätskonzentration von 333 kBq / ml festgestellt werden, während die LD_{50} in

Zellsuspension nur 150 kBq / ml betrug. Ein unspezifisches RIK vernichtete dagegen 50% der Zellen in Suspension erst bei einer Aktivitätskonzentration von 444 kBq / ml (Miederer et al., 2003).

In einer anderen Studie zur in vitro Zytotoxizität an der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 konnte gezeigt werden, dass eine Internalisierung, also die Aufnahme radiomarkierter Antikörper in die Zelle, zur Abtötung der Zellen nicht unbedingt notwendig ist, da eine letale Bestrahlung der Zelle durch die Reichweite des α -Emitters gewährleistet ist (Kelly et al., 2007). Internalisierte RIK's wirken sich dennoch vorteilhaft in der Radioimmuntherapie aus, da die Strahlung internalisierter Radioisotope eine höhere Wahrscheinlichkeit des Durchdringens des Zellkerns aufweist als die des zellmembrangebundenen RIK (Borchardt et al., 2003).

In vivo

In Langzeitbeobachtungen zeigte sich die Toxizität Radiometall-markierter Immunkonjugate in vivo histopathologisch an den Nieren, die somit das dosislimitierende Organ darstellen (Behr et al., 1997). In einer Studie zur Pharmakokinetik von ^{213}Bi -Konjugaten konnte abhängig von der applizierten Aktivität 20-30 Wochen nach i.p. Injektion eine strahleninduzierte Nephropathie bei Mäusen sowie 13 Wochen nach i.v. Injektion ausgedehnte renale tubuläre Nekrosen bei Kaninchen nachgewiesen werden (Song et al., 2007). Zudem erwies sich nach einer i.v. Applikation das Knochenmark als dosislimitierend.

In einem xenotransplantierten Mausmodell wurde die höchste Aktivität in den Nieren nach i.p. Applikation von 22,2 MBq eines ^{213}Bi -RIK in der Nierenrinde und der äusseren Markzone nachgewiesen. Da die Grösse des intakten RIK bei 150 kDa liegt und somit nicht von den Nieren filtriert werden kann, kann man bei der nachgewiesenen Aktivität davon ausgehen, dass es sich um freies ^{213}Bi handelt, welches sich vom RIK gelöst hat. Die Nierentoxizität zeigte sich histopathologisch als hyalinisierte Glomerula mit Glomerula-Sklerose und ödematisierten tubulären Epithelzellen (Beck et al., 2007) (Abb. 5).

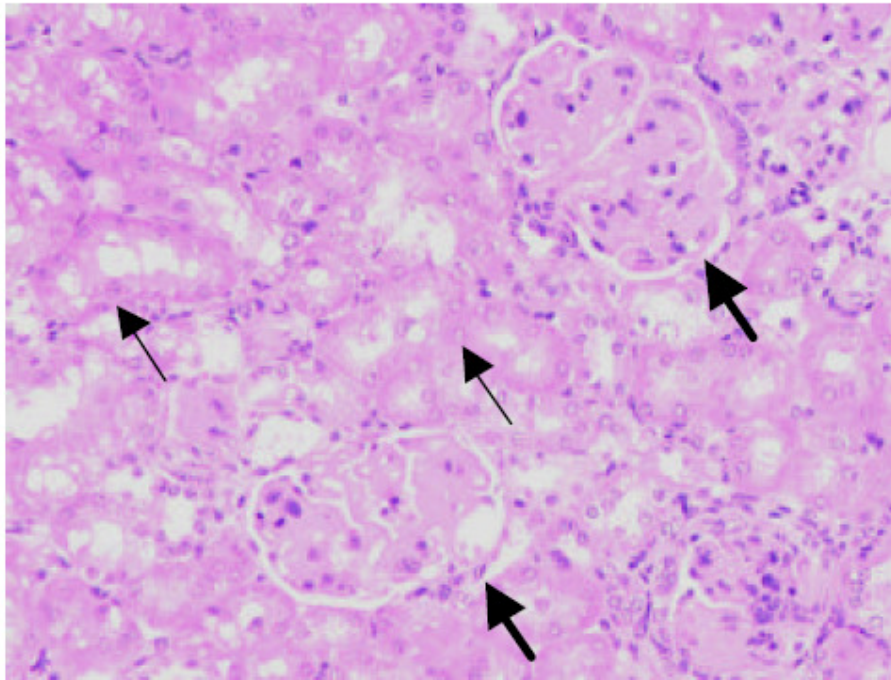


Abb. 5: Glomerula der Niere einer Nacktmaus, 160-fache Vergr.

Dünne Pfeile: ödematisierte Tubulusepithelzellen mit vergrößerten Kernen

Dicke Pfeile: hyalinisierte Glomerulaschlingen (entnommen aus Beck et al., 2007)

2.3 α -Radioimmuntherapie am Mausmodell

Die Durchführung von Tierversuchen ist im 5. Abschnitt des deutschen Tierschutzgesetzes geregelt. Tierversuche dürfen nur durchgeführt werden, wenn deren Unerlässlichkeit am Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse nachgewiesen ist (TierSchG, 2006).

Tiermodelle geben wichtige Informationen über in vivo-Verhalten, Stabilität der markierten Liganden und Toxizität des Radionuklids. Dennoch muss beachtet werden, dass auch Unterschiede in der Immunantwort sowie bei der Pharmakokinetik und Biodistribution der markierten Antikörper zwischen Tier und Mensch bestehen [Buchsbaum, 1997]. In voran gegangenen Studien wurde das zytotoxische Potenzial der α -Strahler zur Therapie der Peritonealkarzinose erkannt und Mausmodelle für eine intraperitoneale Metastasierung entwickelt (Senekowitsch-Schmidtke et al.,

2001; Bloechl et al., 2005; Beck et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Tierexperimente erscheinen hinsichtlich der Effektivität und der Toxizität sehr erfolgversprechend und werden derzeit auf ihre klinische Wertigkeit überprüft. Die ersten Studien, die die Durchführbarkeit einer in vivo- α -Radioimmuntherapie mit ^{212}Bi (HWZ 60,6 min) bewiesen, wurden in einem T-Zell-Aszites Tumormodell in Mäusen durchgeführt (Macklis et al., 1988) und verifizierten die Spezifität der α -Radioimmunkonjugate in einem in vivo-Modell (McDevitt et al., 1998). Die guten pharmakokinetischen und therapeutischen Ergebnisse in einem weiteren Mausmodell zur Leukämie bewiesen die in vivo-Stabilität der ^{212}Bi -DOTA-Chelat-Konstrukte und führten zu klinischen Studien am Menschen (Ruegg et al., 1990).

Die vorliegende Studie ist vor dem Hintergrund bis dato unbefriedigender Therapieergebnisse nach einer transurethralen Resektion, bei der es trotz darauffolgender intravesikaler Instillation von Mitomycin C immer noch bei bis zu 40% der Patienten zum Rezidiv kommt, erfolgt. Die Vermeidung der radikalen Zystektomie als ultima ratio erfordert die Erprobung neuer konservativer Therapiemöglichkeiten am Tiermodell. Durch die rasche und unkomplizierte Verfügbarkeit von ^{213}Bi eröffnet die α -Radioimmuntherapie mit diesem Nuklid viel versprechende Therapiemöglichkeiten, die einen neuen Ansatz für die Bekämpfung des Tumorrezidivs nach transurethraler Resektion eines oberflächlichen Blasenkarzinoms darstellen. Um ein möglichst realistisches Modell zu erhalten, versucht man sich der Situation nach TUR beim Menschen mit Hilfe eines Tiermodells anzunähern. Da vor allem bei kurzlebigen Radionukliden wie ^{213}Bi eine schnelle Bindung des markierten Antikörpers an die Tumorzelle wichtig ist, erfolgt die Applikation des ^{213}Bi -MAK lokoregional in die Blase.

In vitro-Studien zur Zytotoxizität des RIK ermöglichen es, die Versuchstierzahlen möglichst gering zu halten und werden als Grundlage der Entwicklung eines Mausmodells berücksichtigt, ebenso wie bereits gewonnene Daten aus ähnlich konzipierten Tierversuchen. Daher gehen dem tierexperimentellen Teil dieser Arbeit ausgiebige in vitro-Studien voraus. Zellkulturen liefern jedoch keine Grundlage für die Ermittlung der Ganzkörperstrahlendosis, und so kann auch die therapeutische Effizienz im Vergleich zur Ganzkörpertoxizität nicht in Zellmodellen ermittelt werden. Die Bioverteilung der Radioimmunkonjugate ist somit von großer Bedeutung.

Vor der Genehmigung einer radioaktiv-markierten Substanz für die Anwendung am Menschen durch das Bundesamt für Strahlenschutz müssen neben Daten zur Effektivität der Therapie ausreichend Daten vorliegen, die eine Abschätzung der Ganzkörperstrahlendosis und somit der Ganzkörpertoxizität erlauben. Solche Daten können für die ^{213}Bi -gekoppelten Immunkonjugate nur im Tierexperiment gewonnen werden. Unterschiede zur Übertragbarkeit der Erkenntnisse aus dem Tiermodell auf den Menschen ergeben sich aus der Grössendifferenz. Da ein Kleinsäuger eine wesentlich höhere Stoffwechselrate als der Mensch hat und somit pharmakologische Wirkstoffe anders abbaut, ergibt sich eine verkürzte biologische Halbwertszeit des RIK (Wahl, 1994). So muss berücksichtigt werden, dass beispielsweise die Anreicherung des RIK im Blut des menschlichen Organismus nach i.p. Applikation langsamer erfolgt als bei Mäusen und auch die erreichten Maximalwerte niedriger sind (Larsen et al., 1995). Die Gewinnung solcher Erkenntnisse, die für die Erprobung neuer therapeutischer Strategien von Bedeutung ist, kommt daher nicht ohne in vivo-Studien in Tierexperimenten aus.

„Wenn man eine Katze auseinandernehmen will, um zu sehen, wie sie funktioniert, hat man als erstes eine nicht funktionierende Katze in den Händen.“

Douglas Adams

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien, Chemikalien und pharmakologische Wirkstoffe

Aceton	Apotheke rechts der Isar, München
Ammoniumacetat	Sigma, Steinheim
Atipamezol Antisedan®	Pfizer, Karlsruhe
Augensalbe, Vidisic®	Dr. Mann Pharma, Berlin
Bovines Serum Albumin	Sigma, Steinheim
Carprofen (50mg/ml), Rimadyl®	Pfizer, Karlsruhe
Chelex 100 Sodium	Sigma, Steinheim
EDTA 1% in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	c.c. pro, Neustadt
Eosin	Chroma-Gesellschaft, Köngen/N.
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
Fentanyl, Fentanyl®	Janssen-Cilag, Neuss
FKS (Fötales Kälberserum)	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Flumazenil Anexate®	Roche Pharma, Schweiz
Formalin 4% (Stammlösung 37%)	Merck, Darmstadt
Genitacin 50mg/ml	Gibco, U.K
Glyceringelatine, Kaisers	Merck, Darmstadt
Hämalaun, Mayers	Apotheke rechts der Isar, München
Hämatoxilin	Merck, Darmstadt
Isofluran, Forene®	Abbott, Wiesbaden
Kältespray (Tetrafluorethan)	neoLab Migge, Heidelberg
Ketavet (100mg/ml Ketaminhydrochlorid)	Pharmacia & Upjohn, Erlangen
Luciferin D-luciferin sodium 99%	Synchem, Kassel
Medetomidin, Domitor®	Pfizer, Karlsruhe
Midazolam, Dormicum®	Roche Pharma, Schweiz

Mitomycin C 2mg	Medac, Hamburg
NaCl-Lösung, 0,9%	Delta-Pharma, Pfullingen
Naloxon Narcanti®	Janssen-Cilag, Neuss
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumjodid 99,5%	Sigma, Steinheim
Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
Objektträger Superfrost®Plus	Menzel, Braunschweig
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
PD-10 Desaltin columns	GE Healthcare, Freiburg
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Peroxidase Substrat Kit DAB SK-4100	Vector, Burlington, CA, USA
pH-Indikatorstäbchen pH 4.0-7.0	Merck, Darmstadt
Polyklonaler Kaninchen-anti human- IgG-AK, HRP konjugiert	DakoCytomation, Dänemark
RPMI 1640 Medium, FG1215	Biochrom, Berlin
Salzsäure 30%	Merck, Darmstadt
Szintillationsfolie für µ-Imager	Decon Science Tec, Hohengandern
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finotek, Niederlande
Triton X	Sigma, Steinheim
Tween-20	Sigma, Steinheim
Ultraschallgel Thyronajod®	BFM, Grebenhain/Oberwald
Urin-Analysestreifen Multistix®10SG	Bayer Vital, Fernwald
Vitamin C	Sigma, Steinheim
Venenkatheter BD 26 Gauge	Becton Dickinson, Heidelberg
Well-Plates	Greiner bio-one, Solingen
Xylazinhydrochlorid 2%, Rompun®	Bayer Vital, Leverkusen

3.1.1 Anästhesie und Analgesie

Ketavet-Rompun Injektionsanästhesie:

82% physiologische NaCl-Lösung, 0,9%

10% Ketavet® (100mg/ml Ketaminhydrochlorid)

8% Rompun® (2% Xylazinhydrochlorid)

Vollständig antagonisierbare Injektionsnarkose:

Narkotikum

Wirkstoff (Marke)	Menge in µg/kg Maus	Konzentration mg/ml
Medetomidin (Domitor®)	500	1
Midazolam (Dormicum®)	5	5
Fentanyl (Fentanyl®)	50	0,05

Antagonist:

Wirkstoff (Marke)	Menge in µg/kg Maus	Konzentration mg/ml
Atipamezol (Antisedan®)	2,5	5
Flumazenil (Anexate®)	0,5	0,1
Naloxon (Narcanti®)	1,2	0,4

Isofluran Inhalationsanästhesie:

Isofluran (Forene®), Trägergas O₂,

Anflutung mit Isofluran 3% und O₂ 4l/min

Erhaltung mit Isofluran 1,5% und O₂ 2l/min

3.1.2 ZellkulturmedienRPML 1640 Medium (Biochrom, Berlin):

(NaHCO₃ (2,0 g/l); stabiles Glutamin; geringes Endotoxin)

Zusätze:

10% FKS

1% Nicht-essentielle Aminosäuren

1% Penicillin/Streptomycin

1% Genitacin

Phosphatpuffer (PBS) (Biochrom, Berlin):

(NaCl (8 g/l); KCl (0,2 g/l); KH₂PO₄ (0,2 g/l); Na₂HPO₄ x 12 H₂O (2,85 g/l); pH = 7,2)

+ EDTA 1% in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺

3.2 Geräte

Analysenwaage Sartorius, Typ LA 230S-OCE	Sartorius, Göttingen
Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Osterode
Cell Counter, CASY®	Schärfe, Reutlingen
CO ₂ -Kammer	Klinikum r. d. Isar, München
Gamma-Counter TYP 1480 Wizard TM 3	Wallac, Finnland
HF-Chirurgiegerät Erbotom 70	Erbe, Tübingen
Isofluran-Verdampfer Völker DE-0131	Völker, Kaltenkirchen
IVC-Käfigsystem Typ BOXUNCP04TCS	Tecniplast S.P.A., Italy
Kryostat Microm, Typ HM 500	Microm, Walldorf
Laminar-Flow-Arbeitsbank	Heraeus-Instrumente, Osterode
Mäusewaage, Laboratory LC 1200S	Sartorius, Göttingen
Micro-Imager µ-IMAGER™	Biospace, Paris, Frankreich
MicroPET Siemens Focus 120	Siemens, Knoxville, TN, USA
Optical Imaging CCD-Kamera und Verstärker	Hamamatsu, Herrsching
Ultraschallgerät Siemens Sonoline Elegra	Siemens, Erlangen

3.3 Verwendete Antikörper

Die drei in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden zur Ermittlung der höchsten Bindung an humane Harnblasenkarzinomzelllinien eingesetzt und sind von den Firmen Serotec Ltd, Oxford, UK (CD227); Wilex AG, München (cK931) und Merck AG, Darmstadt (EMD 72000) entwickelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden.

3.3.1 Anti-EGFR Antikörper EMD 72000 (Matuzumab)

Der EGF-Rezeptor stellt ein transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 170 kDa dar. EMD 72000 ist ein humanisierter muriner monoklonaler Antikörper der Immunklasse IgG1 gegen den EGF-Rezeptor, der die Wachstumsfaktorbindung an EGFR von humanen malignen Zellen kompetitiv hemmt und bereits in klinischen Studien der Phase II eingesetzt wird. Dieser Antikörper zeigte in unseren vorangegangenen Bindungsstudien das höchste Bindungsverhalten an der Harnblasenkarzinom-Zelllinie EJ 28.

3.3.2 Anti-EpCAM Antikörper CK 931

Der monoklonale Antikörper cK931 erkennt das EpCAM-Antigen, welches von soliden Magen-, Darm-, Prostata-, Brust- und Lungentumoren exprimiert wird. Eine Überexpression von EpCAM wurde auch bei fortgeschrittenen Urothelkarzinomen nachgewiesen (Brunner et al., 2008). Das epitheliale Zell Adhäsionsmolekül ist ein 40 kDa transmembranes Glycoprotein und ist verantwortlich für die Ca^{2+} -unabhängige Zelladhäsion und –proliferation (Hussain et al., 2007). Der Antikörper cK931 zeigte in präklinischen Studien ein sehr hohes Bindungsverhalten an EpCAM exprimierende Tumorzellen (Willex AG, München 2003).

3.3.3 Anti-MUC1 Antikörper CD227 (C595 NCR48)

MUC1 (Mucin-1) kommt als mucinöses Glykoprotein protektiv auf physiologischen Urothelzellen vor und ist auf malignen Urothelzellen überexprimiert (Hughes et al., 2000, Murray et al., 2001). Der monoklonale Antikörper CD227 (Klon C595 (NCR48)) erkennt das Ziel-Epitop Arg-Pro-Ala-Pro innerhalb des Proteinkerns des MUC1 und gehört der Immunklasse IgG3 an.

3.4 Radionuklide und Radiotracer

3.4.1 Wismuth-213 (^{213}Bi)

Der α -Strahler ^{213}Bi ist ein Zerfallsprodukt von Actinium-225. Mit einer Halbwertszeit von 45,6 min werden 98% des ^{213}Bi unter β^- -Zerfall in ^{213}Po umgewandelt, welches wiederum mit einer Halbwertszeit von nur 4,2 μsec unter Aussendung von α -Strahlung in ^{209}Pb zerfällt. Aufgrund dieser sehr kurzen Halbwertszeit spricht man von ^{213}Bi als einem α -Strahler, obwohl die α -Teilchen mit einer Energie von 8,45 MeV eigentlich von ^{213}Po emittiert werden.

Die restlichen 2% des ^{213}Bi senden zunächst ein α -Teilchen aus, in der Folge entsteht ^{209}Tl . Mit einer Halbwertszeit von 2,2 min erfolgt der β^- -Zerfall zu ^{209}Pb , welches sich mit einer Halbwertszeit von 3,3 h in stabiles ^{209}Bi umwandelt. Beim ^{213}Bi -Zerfall tritt zudem γ -Strahlung mit einem Energiemaximum von 440 keV auf. Diese wird zur Erfassung der Aktivität des ^{213}Bi im Gammacounter genutzt.

Die folgende Abb. 6 stellt das Zerfallsschema des ^{225}Ac über ^{213}Bi zu stabilem ^{209}Bi übersichtlich dar.

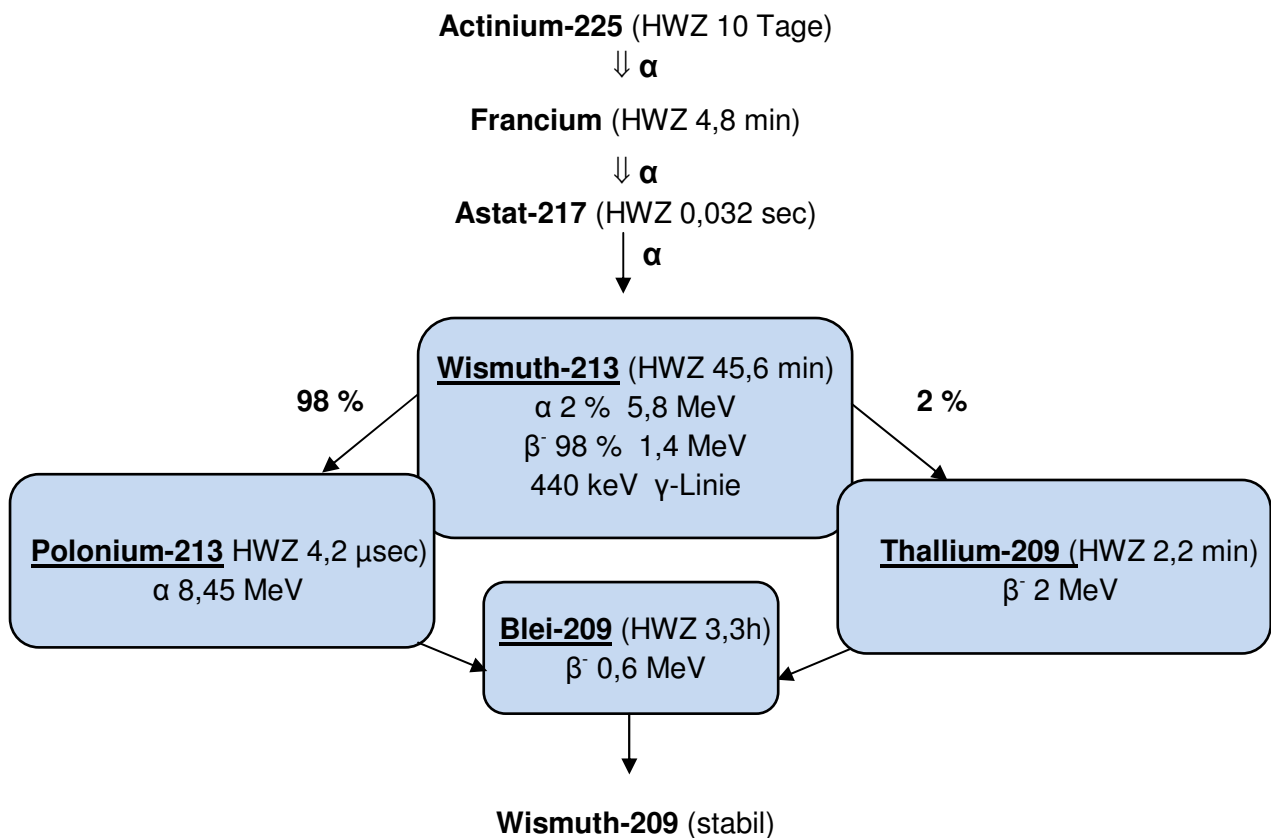


Abb. 6: Zerfallsschema von Actinium-225

3.4.1.1 $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator

^{213}Bi wird in einem etablierten Verfahren aus $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatoren gewonnen, die bisher nur an zwei Einrichtungen weltweit hergestellt werden. Eine ausreichende Verfügbarkeit von ^{213}Bi mittels dieses Generator-Systems ist daher in absehbarer Zeit nicht gegeben.

^{225}Ac entsteht über ^{229}Th aus dem natürlichen Zerfall von ^{233}U (Boll et al., 1997). Daneben wird es durch Neutronenbestrahlung von ^{226}Ra im Hochflussreaktor bzw. durch Protonenbestrahlung von ^{226}Ra im Zyklotron hergestellt. Die für die vorliegenden Studien verwendeten $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatoren wurden am Institut für Transurane der Europäischen Kommission in Karlsruhe hergestellt. Dazu wurde

^{225}Ac trägerfrei aus einem $^{229}\text{Th}/^{225}\text{Ac}$ -Generator mit 0,5 M HNO_3 eluiert, in dem ^{229}Th -Oxid an Titanphosphatharz gebunden vorliegt (Mc Devitt et al., 1998). Anschliessend wurde ^{225}Ac aus dem Gemisch mit ^{225}Ra und ^{224}Ra mittels einer Dowex 50 W x 8 Reinigungssäule separiert. Zur Herstellung des $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators wurden ca. 740 MBq (20 mCi) ^{225}Ac -Nitrat an AGMP-50 Kationen-Austauschharz adsorbiert und mit diesem in eine Fluorpolymer Säule (5,5 cm, $r = 3,2$ mm) überführt (McDevitt et al., 1999, Apostolidis et al., 2001 und 2005).

^{213}Bi wurde eluiert, indem über einen Polyethylenschlauch ($r = 0,8$ mm) 600 μl einer 0,1 M $\text{HCl}/0,1$ M NaI -Lösung in den Generator eingeführt und dort während einer zweiminütigen Reaktionszeit mehrmals durch die Säule vorgedrückt und zurückgesaugt wurden. Im Eluat finden sich $(^{213}\text{Bi}_4)^- / (^{213}\text{Bi}_5)^{2-}$ Anionen (Spivakov et al., 1979). Nach Zugabe CHX-A''-DTPA-chelatierter Antikörper verdrängt das wesentlich stärker komplexierte DTPA das Jodid aus den Bi-Komplexen und wird als $^{213}\text{Bi}^{3+}$ -Ion chelatiert. Fünf Stunden nach dem Eluieren ist das radioaktive Gleichgewicht zwischen ^{225}Ac und ^{213}Bi wieder erreicht und der Generator ist für eine erneute Elution bereit. 90% der maximalen ^{213}Bi -Radioaktivität liegen allerdings schon nach 150 min vor. Zur effizienten Nutzung des Generators empfiehlt sich somit eine ^{213}Bi -Gewinnung im Abstand von etwa 2 bis 2,5 h.

3.4.1.2 Chelatierung der Antikörper

Die Kopplung von ^{213}Bi an Antikörper erfolgt in zwei Schritten. Für die Chelatierung metallischer Nuklide wie ^{111}In , ^{90}Y und ^{213}Bi hat sich CHX-A''-DTPA bewährt (Brechbiel und Gansow 1991, Mirzadeh und Kennel 1996). Zunächst wird der Chelator kovalent an den Antikörper gebunden. Aus sämtlichen für die Bindung von CHX-A''-DTPA an Antikörper verwendeten Pufferlösungen wurden vor Gebrauch Metallionen mittels Chelex 100 bzw. EDTA entfernt. Die kovalente Bindung von CHX-A''-DTPA an die Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht bei pH 8,5 in NaHCO_3 (50 mM)/ NaCl (20 mM) Puffer, wobei 3-5 Chelatormoleküle pro Antikörper-

Molekül gebunden wurde (Nikula et al., 1999). In einem späteren Schritt wird die Kopplung des Isotopes an die vorchelatierten Antikörper durchgeführt.

3.4.1.3 Markierung der chelatierten Antikörper mit ^{213}Bi

Bedingt durch die kurze Halbwertszeit von ^{213}Bi wurde die Kopplung an die Antikörper unmittelbar vor jedem Versuch durchgeführt. Nach Eluierung des $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators mit 600 μl einer 0,1M HCl/0,1M NaI-Lösung wurde das gewonnene ^{213}Bi -Eluat mittels 3M Ammoniumacetat ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) auf einen pH-Wert von etwa 5,5 gepuffert. Um den Antikörper vor Radiolyse zu schützen, wurden 100 μl einer 4%igen L-Ascorbinsäure zugesetzt. 50 bis 100 μg des chelatierten Antikörpers wurden in diese Reaktionslösung pipettiert und der Ansatz 7 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Abtrennung von freiem ^{213}Bi , das nicht durch den Antikörper chelatiert wurde, erfolgte mittels Gelfiltration (PD10, GE Healthcare, Freiburg). Dazu wurde das Volumen der RIK-Lösung zunächst ad 2,5 ml mit PBS aufgefüllt und auf die Säule aufgetragen. Durch Elution mit 2 ml PBS wurden die ^{213}Bi -Immunkonjugate aus der Säule ausgespült. Der Anteil des durch den Antikörper chelatierten ^{213}Bi wurde vor und nach der Gelfiltration mittels Instant Thin Layer Chromatographie geprüft (ITLCTM, Pall Corp.) Dazu wurden 2 μl des 1:100 in PBS verdünnten RIK 5 mm oberhalb eines Endes eines ITLC-Papierstreifens (5x70 mm) pipettiert. Als Laufmittel wurde 0,05M Tri-Natrium-Citrat (pH 5,5) verwendet. Das Laufmittel wandert durch die Kapillarwirkung des ILTC-Streifens nach oben und transportiert dabei freie ^{213}Bi -Ionen. Nachdem das Laufmittel das obere Ende des Papierstreifens erreicht hatte, wurde der Papierstreifen in der Mitte geteilt und die ^{213}Bi -Aktivität beider Teile im Gamma-Counter gemessen. Die Aktivität im unteren Teil repräsentiert den Anteil des ^{213}Bi -Immunkonjugates, diejenige im oberen Teil des Papierstreifens den des freien ^{213}Bi .

3.4.2 ^{11}C -Cholin

^{11}C -Cholin wird in der PET als Positronen-emittierender Tracer eingesetzt. Aufgrund der kurzen HWZ des ^{11}C von 20,3 min wird das Nuklid im „in house“ 11-MeV-Zyklotron (RDS 112, CTI, Siemens) durch Protonenbeschleunigung auf ein ^{14}N -Gastarget hergestellt. Von Tumorzellen wird Cholin vermehrt in Zellwandbestandteile (Membranlipide) eingebaut. ^{11}C -markiertes Cholin (^{11}C -Cholin) wird daher im Tumorgewebe vermehrt angereichert und die Aufnahme im Gewebe kann mittels Positronen-Emissions-Tomographie quantitativ bestimmt und dargestellt werden.

Cholin, ein Aminoalkohol, wird durch die Nahrung über den Darm aufgenommen und in der Leber verstoffwechselt. Durch die rasche hepatische Metabolisierung und die geringe Ausscheidung über den Urin bietet sich ^{11}C -Cholin vor allem in der Darstellung urologischer Tumoren an und zeigte gute Ergebnisse bei der Darstellung von Prostatakarzinomen (De Jong et al., 2003; Kumar et al., 2004). Die radiochemische Synthese von ^{11}C -Cholin wurde in der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik, Technische Universität München, durchgeführt.

3.5 Zelllinien und Zellkultur

3.5.1 Zelllinien des humanen Harnblasenkarzinoms

Für die Bindungsstudien mit den ^{213}Bi markierten monoklonalen Anti-EGF-Antikörpern Matuzumab (EMD 72000, Fa. Merck), Anti-MUC1-MAK CD227 (Serotec Ltd, Oxford, UK) sowie Anti-EpCAM-MAK cK931 (Wilex AG, München) wurden die Zelllinien 647 V; EJ 28; T 24; RT 112 und J 82 ausgewählt. Diese Zelllinien repräsentieren in erster Linie das Urothelkarzinom als die am häufigsten vorkommende Form des humanen Harnblasenkarzinoms und wurden zu Beginn dieser Studie ausgewählt, um diejenige Zelllinie mit der höchsten Bindung der ^{213}Bi -markierten Antikörper für das Mausmodell zu ermitteln.

Tab.1: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

<i>Zelllinie</i>	<i>Beschreibung, Herkunft</i>	<i>Wuchsform</i>	<i>Morphologie</i>
647 V	Humanes Urothelkarzinom (maligne, histolog. Grad II), isoliert aus einem Primär-Harnblasenkarzinom (Herkunft und Patient unbekannt)	Monolayer	adhärent epithelial
RT 112	Humanes Urothelkarzinomkarzinom (histolog. Grad II, gut differenziert), isoliert aus einem unbehandelten Primär-Harnblasenkarzinom eines weibl. Patienten (Alter und Herkunft unbekannt)	Monolayer	adhärent epithelial
T 24	Humanes Urothelkarzinom (histolog. Grad III), isoliert aus einem Primär-Harnblasenkarzinom einer 81-jährigen kaukasischen Frau	Monolayer	adhärent epithelial
J 28	Humanes Urothelkarzinom (histolog. Grad III, stark entdifferenziert), invasiv wachsend, isoliert aus einem Primär-Harnblasenkarzinom eines 58-jährigen kaukasischen Mannes	Monolayer	adhärent epithelial
EJ 28	Humanes Urothelkarzinom (histolog. Grad III-IV, stark entdifferenziert), invasiv wachsend, isoliert aus einem metastasierendem Primär-Harnblasenkarzinom eines Kaukasiers (Geschlecht und Alter unbekannt)	Monolayer	adhärent epithelial

3.5.2 Kultivierung der Zellen

Die Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, Berlin) mit 10% FCS, 1% nicht-essentielle Aminosäuren (NEAS) (Biochrom AG, Berlin), 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin) kultiviert bei 37°C, 5% CO₂ sowie 100% Luftfeuchtigkeit. Zusätzlich wurde dem Kulturmedium der Harnblasenkarzinomzellen 1 µg/ml Gentamycin (Biochrom AG, Berlin) zur prophylaktischen Verhinderung von bakteriellen Infektionen der Zellkultur zugesetzt. Mit einem dem Medium zugesetzten pH-abhängigen Indikator wird durch einen Farbumschlag von rot nach gelb die Anreicherung saurer Stoffwechselprodukte angezeigt. Sowohl das Passagieren als auch das Ablösen der Zellen erfolgten in einer Laminar-Flow-Arbeitsbank unter aseptischen Bedingungen. Die Passage der Zelllinien erfolgte jeweils bei einer Dichte von etwa 1×10^7 Zellen (konfluierender Zellrasen) pro Kulturflasche der Grösse 183 cm² ca. alle 2-3 Tage. Bei dieser Zelldichte proliferieren die Zellen exponentiell.

Alle Zelllinien zeigten ein adhärentes epitheliales Wachstum. Die Monolayer wurden nach Absaugen des Kulturmediums durch Spülung mit 10 ml PBS von Zelldetritus und Mediumresten befreit. Dieser Reinigungsschritt erhöht die Effizienz der Ca²⁺-Komplexbildung durch das EDTA und erleichtert das Ablösen der Zellen. Zur Zellablösung wurden 7 ml 1mM EDTA in PBS pro Kulturflasche zugegeben und diese bei 37°C für 15 min inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden anschliessend in sterile Zentrifugenröhrchen pipettiert und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellsediment zur Passagierung oder nachfolgenden Ermittlung der Zellzahl für weitere Versuche mit FKS-haltigem Medium resuspendiert.

3.5.3 Transfektion der Zelllinie EJ 28 mit Luciferase

Zum Nachweis des Wachstums der Tumorzellen in vivo mittels Biolumineszenz Imaging wurde die humane Harnblasenkarzinomzelllinie EJ 28 stabil mit Firefly (*Photinus pyralis*) Luciferase transfiziert (freundlicherweise durchgeführt und zur

Verfügung gestellt von Dr. D. Saur, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München). Für die Plasmid Konstruktion wurde die kodierende Sequenz der Firefly Luciferase (fluc) durch enzymatische *HindIII* und *XbaI*-Restriktionsspaltung von dem Vektor pGL3-basic (Promega, Mannheim) herausgeschnitten. Die überhängenden Nukleotidsequenzen wurden aufgefüllt, so dass glatte Enden des Restriktionsfragmentes entstehen. Der Vektor pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe) wurde mittels *XhoI*-Restriktionsspaltung geöffnet, die entstandenen überhängenden Enden wurden aufgefüllt und das Restriktionsfragment anschliessend in den Vektor hineinligiert. Das Klonierungsergebnis (pcDNA3.1-fluc) wurde durch DNA-Sequenzierung (GATC, Konstanz) mit dem ABI Prism 377 DNA-Sequenzier (Applied Biosystems, Darmstadt) bestätigt.

Die Transfektion der EJ 28-Zellen erfolgte mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1-fluc unter der Kontrolle des Cytomegalievirus-Promotors. Hierzu wurden konfluierende Zellen in six-well-plates mit 0,8g pcDNA3.1-fluc, 20µl Effectene und 6,4µl Enhancer pro well nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) inkubiert. Stabil transfizierte Zellklone wurden durch Zugabe von 800µg/ml Geneticin selektioniert (Buchhorn et al., 2007). Die EJ 28-luc-Zellen wurden in RPMI-Medium (Biochrom AG, Berlin) mit 10% FKS, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin), 1% NEAS (Biochrom AG, Berlin) und 1% Geneticin (Invitrogen, Karlsruhe) kultiviert bei 37°C, 5% CO₂ sowie 100% Luftfeuchtigkeit.

3.6 Bindungsstudien

Zur Einstellung der Zellzahl für die Bindungsstudien wurden 10 µl der Zellsuspension in 10 ml Verdünnungslösung für Zellkulturen (CASY[®]ton, Schärfe System Reutlingen) pipettiert und mit Hilfe des Zellzählgerätes (CASY[®]1, Schärfe System Reutlingen) auf 3×10^6 Zellen eingestellt. Zur Erreichung gleicher Volumina für die Dreifach-Ansätze bei den Bindungsstudien wurden die so eingestellten Zellsuspensionen mit einer entsprechenden Menge RPMI-Nährmedium auf 1000 µl je Ansatz aufgefüllt.

Ein Vergleich der spezifischen Bindungsfähigkeit der Radioimmunkonjugate ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAk und ^{213}Bi -Anti-MUC1-MAk wurde an allen fünf Zelllinien bei 37°C und 4°C sowie mit ^{213}Bi -Anti-EpCAM-MAk bei 37°C Inkubationstemperatur durchgeführt, um eventuelle Unterschiede der Bindungswerte bei Körpertemperatur zu erfassen. Zudem wurde getestet, ob die Bindung von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAk an EJ 28 Zellen durch die Transfektion der Zelllinie mit Luciferase beeinflusst wird.

Die Bindung wurde pro Zelllinie und Antikörper in Dreifach-Ansätzen bestimmt. Das gewählte Verfahren ist bei Nikula et al., 1999 beschrieben und wurde hierfür geringfügig modifiziert. Dazu wurden pro Ansatz 3×10^6 Zellen in einem Volumen von 1000 µl RPMI-Nährmedium 30 min mit 37,5 ng ^{213}Bi -markiertem Antikörper bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen bei 1500 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand in ein separates Messröhrchen abpipettiert. Das Zellpellet wurde mit 500 µl RPMI-Nährmedium gewaschen, zentrifugiert und der Überstand in ein zweites Messröhrchen überführt. Die Zellpellets und die Überstände wurden separat im Gamma-Counter Typ 1480 Wizard TM 3 (Wallac, Finnland) gemessen und die an den Zellen verbliebene Aktivität in Prozent der zugegebenen Gesamtaktivität berechnet.

3.7 Scatchard Analyse und Internalisierungskinetik

Von Scatchard wurde 1949 zum ersten Mal ein Radiorezeptorassay beschrieben. Dieses Verfahren hat sich mit kleinen Modifikationen als gängige Methode zur Rezeptorquantifizierung durchgesetzt.

Mittels Scatchard Analyse wurde sowohl die Affinität der ^{213}Bi -anti-EGFR-Konjugate als auch die Antigendichte der Zelllinien EJ 28 und RT 112 bestimmt. Dazu wurden in Dreifach-Ansätzen 1×10^6 Zellen in 200 µl PBS / 1% BSA mit unterschiedlichen Konzentrationen von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk (5 - 320 ng/100 µl) für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen bei 1200 rpm für 3 min abzentrifugiert und dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Die Überstände wurden jeweils in ein Röhrchen pipettiert und die Aktivität der Zellpellets und der Überstände separat im Gamma-Counter gemessen.

Die gebundene Antikörpermenge wurde in Abhängigkeit der Antikörperkonzentration bestimmt. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde auf der x-Achse die Masse (ng) des gebundenen Antikörpers (B) und auf der y-Achse der Quotient aus gebundenem und freiem Antikörper (B/F) aufgetragen. Bei linearem Verlauf lassen sich über die resultierende Regressionsgerade ($y = m \cdot x + b$) die Anzahl der gebundenen Antikörper (B_{\max}) sowie die Dissoziationskonstante (K_d) bestimmen. B_{\max} ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse. Aus dem Wert für B_{\max} lässt sich die Anzahl der Antigenbindungsstellen mit Hilfe folgender Gleichungen berechnen:

$$m = M_m \cdot n = \frac{M_m \cdot Z \cdot A}{N_A}$$

$$A = \frac{m \cdot N_A}{M_m \cdot Z}$$

M = Masse des maximal gebundenen AK (g)

M_m = Molekulargewicht eines AK (IgG) 150.000 g

n = Stoffmenge (mol)

Z = Zellanzahl

A = Anzahl der maximal gebundenen AK (= Anzahl der Antigene)

$N_A = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ (Avogadro-Konstante)

Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse ergibt $\frac{B_{\max}}{K_d}$.

Internalisierungskinetik

Studien zur Internalisierungskinetik des Radioimmunkonjugats ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAK wurden mit EJ 28-luc in Zweifachansätzen wie folgt durchgeführt: Pro Ansatz wurden 3×10^6 Zellen in 1000 μl RPMI-Medium 30 min mit 0,185 MBq (250 ng AK) ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK bei 4°C inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen bei 1500 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand \ddot{U}_1 (enthält ungebundenen Antikörper) in ein separates Messröhrchen abpipettiert. Auf das Zellpellet wurden 1000 μl RPMI-Medium (37°C) pipettiert, das Pellet darin resuspendiert und bei 37°C inkubiert. Nach jeweils 10, 30 und 60 min wurden die Ansätze wieder zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und zu den Messröhrchen mit \ddot{U}_1 gegeben. Zur Ablösung oberflächlich gebundener RIK wurden die Zellen in 1000 μl „Sheddinglösung“ (0,2 M Essigsäure in 0,5 M NaCl, pH 2,8) resuspendiert und 5 min bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand \ddot{U}_2 (enthält zellgebundenen AK) in ein zweites Messröhrchen überführt. Es erfolgte eine zweite Waschung des Zellpellets mit 500 μl „Sheddinglösung“ und eine unmittelbar daran anschliessende Zentrifugation und Abpipettierung des Überstandes \ddot{U}_3 in ein drittes Messröhrchen [Benesch et al., 2005]. Die Zellpellets und die Überstände \ddot{U}_{1-3} wurden separat im Gamma-Counter Typ 1480 Wizard TM 3 (Wallac, Finnland) gemessen. Die Messergebnisse wurden zur Berechnung der Anteile von zellgebundenem bzw. internalisiertem ^{213}Bi -anti-EGFR-Konjugat zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubationsbeginn herangezogen.

3.8 In vitro Biolumineszenz-Imaging

Das Biolumineszenz Imaging visualisiert Lichtemissionen, die bei der Umsetzung des Substrats D-Luciferin durch das Enzym Luciferase in Anwesenheit von ATP und Sauerstoff freigesetzt werden. Zur Erfassung der Biolumineszenz wurde eine gekühlte CCD-Kamera (-70°C) mit Bildverstärker (Hamamatsu, Herrsching) verwendet, verbunden mit computergestützter Bildanalyse und Bildverarbeitung (Simple PCI, Hamamatsu, Herrsching). Die hochauflösende Kamera erfasst ein Lichtspektrum von 350nm bis 850nm und ist somit für die Darstellung des bei der Luciferase-Luciferin Reaktion entstehenden Lichts mit der Wellenlänge von 562nm bestens geeignet.

Zum Nachweis des Wachstums der Tumorzellen wurde die humane Harnblasenkarzinomzelllinie EJ 28 stabil mit Firefly (*Photinus pyralis*) Luciferase transfiziert. Die zu untersuchenden Objekte wurden für die Aufnahmen mit der CCD-Kamera in einer Dunkelkammer platziert. D-Luciferin-Natrium-Salz (Synchem, Kassel) wurde in sterilem Wasser gelöst und in einer Konzentration von 15 mg/ml in Aliquots zu 1,5 ml bei -70°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der im Optical Imaging erfassbaren Zellzahl wurden 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 und 1×10^5 EJ 28-luc Zellen in 200 µl RPMI-Medium in jeweils 12 Wells einer schwarzen 96-Well-Platte mit durchsichtigem Boden (µClear-Plate, Greiner bio-one, Solingen) so ausgesät, dass jedes zellgefüllte Well von mediumgefüllten Zellen umgeben war, um überschneidende Lichteffekte während der Aufnahmen zu vermeiden. Die Zellen wurden 24 h inkubiert, bevor 10 µl D-Luciferin (15 mg / ml) hinzu pipettiert wurde. Das Biolumineszenz Imaging wurde 5 min nach Zugabe von 10 µl D-Luciferin mit zwei Belichtungszeiten (60 und 90 sec) durchgeführt.

3.9 Klonogener Assay (24-well-plate clonogenic assay)

Mit Hilfe des klonogenen Assays soll die Vitalität von Tumorzellen beurteilt werden, insbesondere unter einer experimentellen Therapie mit Zytostatika, Bestrahlung, Radionukliden oder Radioimmunkonjugaten. Als Beurteilungsparameter dient die Anzahl von Zellkolonien, die nach einem bestimmten Zeitintervall aus Einzelzellen im Medium entstanden sind.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität des ^{213}Bi -Immunkonjugates auf die Zelllinie EJ 28 wurde ein klonogener Assay durchgeführt. Diese Zelllinie zeigte die höchste Bindung des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk und die höchste Expression von EGFR Molekülen. Ziel dieses Versuches war es, die minimale Strahlendosis mit letaler Wirkung auf die Zellen herauszufinden. Da nicht alle Tumorzellen fähig sind, aus einer Zelle eine Kolonie zu bilden, sondern einen Zellverbund dazu benötigen, wurde in einem Vorversuch das Proliferationsverhalten der Zelllinie EJ 28-luc getestet.

Zugleich wurde auf diesem Weg die optimale Zellkonzentration, d.h. die minimale Anzahl von Zellen pro well, die für die Ausbildung von Klonen notwendig ist, bestimmt.

Ermittlung der optimalen Zellzahl:

Eine 24-well-plate wurde mit 1 ml RPMI-Medium (+ 10 % FKS, + 1% Penicillin/Streptomycin, + 1 % nicht-essentielle Aminosäuren) pro Vertiefung (well) befüllt. Die zu untersuchende Zelllinie wurde von der Kulturflasche abgelöst, resuspendiert und im Zellzählgerät auf 1×10^6 Zellen / ml eingestellt. Nach einer erfolgten Verdünnungsreihe wurden die unbehandelten Zellen in Konzentrationen von 50 bis 400 Zellen pro well eingesetzt. In die 6 Vertiefungen der ersten Reihe wurden je 50 Zellen; in die zweite Reihe je Vertiefung 100 Zellen; in die dritte Reihe jeweils 200 Zellen und in die vierte Reihe 400 Zellen pro well pipettiert. Nach einwöchiger Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit wurden die Kolonien unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt. Ein Klon sollte hierbei mindestens aus 50 Zellen bestehen. Die Zellzahl, bei der unter den genannten Bedingungen 50 Kolonien wuchsen, wurde als optimale Zellzahl für den klonogenen Assay mit der ²¹³Bi-Anti-EGFR-MAK Radioimmuntherapie ausgewählt.

Durchführung des klonogenen Assays mit ²¹³Bi-Anti-EGFR-MAK-Inkubation:

Die EJ 28-luc-Zellen wurden von der Kulturflasche abgelöst, resuspendiert und im Zellzählgerät auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Nach einer erfolgten Verdünnungsreihe wurden die unbehandelten Zellen in einer Konzentration von 100 Zellen pro well eingesetzt. Zur Ermittlung der minimalen Strahlendosis mit letaler Wirkung auf die Zellen wurden vier 24-Loch Platten pro Vertiefung mit je 100 Zellen pro ml Medium befüllt und für 24 h inkubiert. Eine Platte diente als Kontrollplatte und erhielt pro Vertiefung 100 µl PBS, die anderen drei Platten erhielten pro Vertiefung jeweils 0,37 MBq, 0,74 MBq und 1,48 MBq ²¹³Bi-Anti-EGFR-Mak in je 100 µl PBS.

Nach einwöchiger Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit wurden die überlebenden Koloniezahlen unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt und der gebildete Mittelwert in Prozent des Kontrollwertes angegeben.

3.10 Tierexperimente

3.10.1 Versuchstiere und Haltung

Weibliche Swiss nu/nu Mäuse im Alter von 6 Wochen wurden aus spezifiziert pathogenfreier Zucht (Charles River, Frankreich) bezogen und in gemäss dem Sozialverhalten der Tiere ausgestalteten IVC-Käfigen zu je 5 Tieren in einem Tierstall mit speziellem Lichtprogramm bei 26°C und 50-60% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die ad-libitum Versorgung wurde mit Mäusestandardfutter Altromin 1314 und Leitungswasser sichergestellt. Zweimal wöchentlich wurden die Käfige gereinigt, desinfiziert und mit Altromin Faser-Einstreu versehen. Eine tiergerechte Ausgestaltung der Käfige wurde mit autoklavierten Papierrollen und Zellstofftüchern vorgenommen. Die Einstellung der Tiere erfolgte mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn.

Die Tierversuche wurden mit Genehmigungen der Regierung von Oberbayern mit den AZ-Nummern 55.2-1-54-2531-34-2002 sowie 55.2-1-54-2531-50-2008 durchgeführt.

3.10.2 Anästhesie der Maus

Zur Anästhesie wurden den Tieren intraperitoneal entweder die dem Körpergewicht angemessene Menge des Xylazin-Ketamin-Gemisches zur Bildgebung im Biolumineszenz Imaging oder die voll antagonistisierbare Narkotikakombination (siehe

3.1.1) für die Xenotransplantation injiziert. Die Augensalbe Vidisic® wurde während des Fehlens des Lidschlussreflexes auf der Cornea verteilt. Ein rasches Auskühlen der Tierkörper, insbesondere bei den Nacktmäusen, als Folge von narkosebedingt reduziertem Stoffwechsel, wurde durch Einsatz einer Wärmematte oder einer Infrarotlampe verhindert. Eine adäquate Schmerzprophylaxe wurde präanästhetisch mit Carprofen (Rimadyl®) p.os oder s.c. durchgeführt. Bei länger andauernden Narkosen wurde zur Vorbeugung einer katabolen Stoffwechsellage zusätzlich ein Infusionsgemisch aus Ringer-Laktat und Glucose 5% s.c. verabreicht.

3.10.3 Etablierung des Urothelkarzinoms in der murinen Harnblase

Die Induktion des humanen Harnblasenkarzinoms in der Maus wurde durch orthotope Xenotransplantation der Luciferase-transfizierten Zelllinie EJ 28-luc (humanes Urothelkarzinom) erreicht. Die intravesikale Tumorzellimplantation wurde modifiziert nach einer Methode von Günther u. Mitarb. (1999) durchgeführt.

Weibliche Swiss nu/nu Mäuse erhielten gemäß ihrem Körpergewicht eine voll antagonistisierbare Narkosekombination aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl als i.p.-Injektion. Nach Eintritt des chirurgischen Toleranzstadiums wurde ein 26-gauge Venenverweilkatheter (Becton Dickinson, Heidelberg) ohne Mandrin mittels Gleitgel (Vidisic®, Dr. Mann Pharma, Berlin) transurethral in die Harnblase vorgeführt und verbliebener Urin abgelassen. Die Mäuse wurden in Rückenlage auf die Neutralisierelektrode der Kautereinheit gelegt. Ein Metalldraht wurde durch den Katheter in die Harnblase eingeführt und vorsichtig bis zur Blasenwand vorgeschoben. Mit dem monopolaren Koagulationsmodus eines Hochfrequenz-Chirurgiegerätes (Erbotom T 71 D, ERBE, Tübingen) wurde pro Tier zwölfmal ein Kontakt zum Metalldraht für je 2 sec. bei 7 W hergestellt und somit mehrere Läsionen in die Harnblasenwand gesetzt um die Situation nach TUR beim Patienten nachzuahmen. Nach Entfernung des Metalldrahtes wurden unterschiedliche Zellkonzentrationen (5×10^4 oder 2×10^6) EJ 28-luc Zellen in 100 µl RPMI-Medium unter Berücksichtigung des Totraumes von Spritze und Katheterkonus intravesikal

instilliert. Nach der Instillation wurden die Katheter mit einer aufgesetzten Spritze verschlossen und in der Harnblase belassen bis die Mäuse aus der Narkose erwachten. Auf diese Weise konnte eine Einwirkzeit der Tumorzellen zur Festsetzung an die Läsionen in der Blase je nach Narkoselänge von 2 bis 3 Stunden gewährleistet werden.

Während der Narkose erhielten die Tiere 200 µl eines Infusionsgemisches aus Ringer-Lactat, Glucose 5% und Carprofen s.c. zur Kreislaufstabilisierung und Schmerzprophylaxe. Postoperativ wurden die Tiere täglich gewogen, das Allgemeinbefinden überprüft und mit Urin-Teststreifen (Multistix®10SG) auf Mikro-Hämaturie untersucht. Die Kontrolle des intravesikalen Tumorwachstums intra vitam wurde sowohl per Ultraschall (Siemens Sonoline Elegra, Siemens, Erlangen) mit einem linearen 13,5 MHz-Schallkopf als auch mittels Biolumineszenz-Imaging (Hamamatsu, Herrsching) und ¹¹C-Cholin-PET durchgeführt, um die bestmögliche und tierschonendste Bildgebung zu ermitteln.

3.10.3.1 Darstellung des Harnblasenkarzinoms in vivo

Sonografie

Die Ultraschallaufnahmen zur Darstellung eines erfolgreichen Xenotransplantats wurden mit einem Sonographiegerät (Siemens Sonoline Elegra, Siemens, Erlangen) mit einer hochauflösenden 13,5 MHz-Sonde durchgeführt. Die hohe Auflösung, verbunden mit einer geringen Eindringtiefe ermöglichte die in vivo Untersuchung der bauchwandnah gelegenen murinen Blase.

Zur genauen Ultraschallkopplung und der Vermeidung der Reflektion des Schalls durch Lufteinschlüsse wurde ein Ultraschallgel (Thyronajod®, BFM, Grebenhain/Oberwald) als Kontaktmittel verwendet. Die Aufnahmen erfolgten im 2D-Echtzeitmodus. Der Vorteil dieses bildgebenden Verfahrens liegt in der Unschädlichkeit der eingesetzten Schallwellen und der schmerzfreien Untersuchung. Von Bedeutung für die Schallausbreitung ist die Impedanz, also der Widerstand,

der der Ausbreitung von Wellen entgegenwirkt. An der Grenzfläche zweier Stoffe mit großem Impedanzunterschied wie z.B. der uringefüllten Blase wird der Schall stark reflektiert. Urin ist gering echogen und stellt sich im Ultraschallbild als schwarze Struktur dar, während sich Blasenwand und Tumorgewebe als Strukturen höherer Echogenität als weissliche Bildpunkte darstellen.

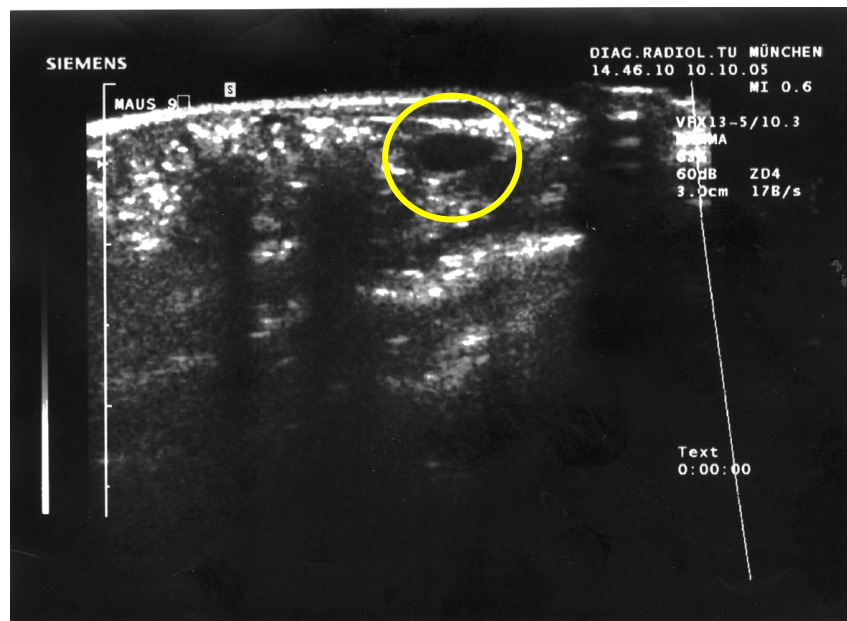


Abb. 7: Ultraschalldarstellung der mässig gefüllten murinen Harnblase (Kreis)

Biolumineszenz Imaging

Ab Tag 7 nach Zellinokulation wurde einmal wöchentlich zur Erfassung der Tumorangehrate und zur Wachstumskontrolle Biolumineszenz Imaging durchgeführt. Für die Aufnahmen wurden die Tiere intraperitoneal mit einer Mischung aus 300 µl D-Luciferin (15 mg/ml) und 170 µl Anästhetikum bestehend aus 82% NaCl, 10% Ketamin (Ketavet®, Pharmacia&Upjohn, Erlangen) und 8% Xylazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen) injiziert. Nach 15 min Einwirkzeit wurden die Mäuse für die Aufnahme auf einem Gelkissen in der Dunkelkammer der CCD-Kamera gelagert.

Die Aufnahmen erfolgten in ventraler, lateraler und dorsaler Position. Zuerst wurden von jedem Tier zur Identifikation und Darstellung der Lagerung Hellfeld-Aufnahmen angefertigt, sofort im Anschluss daran erfolgten die Biolumineszenz Aufnahmen zur Erfassung des Biolumineszenz-Signals des Tumors mit einer Belichtungszeit von 120 sec. Die Auswertung der Bilder erfolgte durch Überlagerung der Hellfeld-Aufnahme mit dem Biolumineszenz-Signal und durch Quantifizierung des Lichtsignals mit dem Programm Simple PCI (Hamamatsu, Herrsching). Hierbei wurde die Lichtemission der Tumorzellen innerhalb einer definierten Region of Interest (ROI) durch Subtraktion des Hintergrundsignals als „Total dose“ bestimmt.

PET

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein bildgebendes Verfahren der Nuklearmedizin, das Schnittbilder von lebenden Organismen nach Injektion eines Positronen-emittierenden Radiotracers erzeugt und damit biochemische und physiologische Vorgänge abbildet. Maligne Tumoren nehmen einige Substanzen, insbesondere Glucose, in deutlich höherem Maße auf als gesundes Gewebe. In der PET-Diagnostik wird deshalb ein Glucose-Derivat (Desoxyglucose) mit dem Radionuklid ^{18}F markiert (^{18}F -FDG) und dem Patienten injiziert. Mittels PET wird die Verteilung dieses Radiotracers im Organismus sichtbar gemacht. Somit erlaubt die PET eine rasche, nicht-invasive *in vivo*-Beurteilung des Tumorwachstums und -stoffwechsels. Die PET verwendet Radionuklide, die Positronen emittieren (β^+ -Strahler). Bei der Wechselwirkung eines Positrons mit einem Elektron im Körper werden zwei Photonen in genau entgegengesetzte Richtungen ausgesandt. Das PET-Gerät enthält viele, ringförmig um den Patienten angeordnete Detektoren für die Photonen. Registriert werden Koinzidenzen zwischen je zwei dieser Detektoren. Aus der zeitlichen und räumlichen Verteilung dieser registrierten Zerfallsereignisse wird auf die räumliche Verteilung des Radiopharmakons und dessen Kinetik im Körperinneren geschlossen und eine Serie von Schnittbildern errechnet. PET ist bei der richtigen Fragestellung ein hochsensitives Verfahren; Aktivitätsanreicherungen lassen sich jedoch anatomisch nicht immer gut lokalisieren, da in PET Bildern in erster Linie Stoffwechselprozesse aufgezeigt werden. Hinzu kommt die begrenzte

Ortsauflösung von ca. 2 mm im Kleintier-PET, welche bei der Darstellung kleinerer Organe wie der murinen Harnblase die korrekte Zuordnung durchaus erschweren kann.

Zur Darstellung des Blasenkarzinoms mittels Kleintier-PET wurde in dieser Arbeit als Radiotracer ^{11}C -Cholin verwendet, welches in der Darstellung von Blasen- und Prostatakarzinomen beim Menschen Verwendung findet, da diese beiden urologischen Tumoren nur eine geringe Anreicherung von ^{18}F -FDG zeigen. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des ^{11}C (20,3 min) erfolgte die Injektion von 10,5 MBq ^{11}C -Cholin intravenös in die Schwanzvene unmittelbar vor der Aufnahme. Die Aufnahmen erfolgten während einer Isofluran-Inhalationsanästhesie der Maus in 7 aufeinanderfolgenden Zeitfenstern von je 1 Minute (dynamischer Modus) mit dem MicroPET Siemens Focus 120 (Siemens, Knoxville, USA).

3.10.4 Bioverteilung von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK

3.10.4.1 Biodistribution

Die Biodistribution, d.h. die Verteilung der RIK in den Geweben der Versuchstiere, wurde sowohl nach intravesikaler als auch nach intravenöser Applikation untersucht. Die intravesikale Instillation der RIK erfolgte analog der Tumorzellinokulation, wie im Tumormodell beschrieben, ebenfalls im Bolus mit Aktivitäten zwischen 1,85 MBq und 6,66 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK in 100 μl PBS an gekauterten und ungekauterten (=intaktes Urothel) Mäusen. Die intravenöse Applikation erfolgte mit 2,96 MBq des Radioimmunkonjugates unter kurzer Isofluran-Inhalationsanästhesie an tumortragenden Mäusen. Unmittelbar vor der i.v. Injektion des RIK in eine der beiden lateralen Schwanzvenen wurde der Schwanz in etwa 45°C warmes Wasser getaucht und anschließend abgetrocknet. Die so dilatierte Schwanzvene wurde mittels 27G Kanüle punktiert und 100 μl des Radioimmunkonjugates i.v. injiziert. Eine Anreicherung der RIK über den Blutweg bietet die Möglichkeit, die Verteilung des RIK sowohl in den Organen als auch im Tumor zu verfolgen.

Die zu applizierende Aktivität ist abhängig von der HWZ des verwendeten Radionuklids und dem Abtötungszeitpunkt. Um in allen Geweben Impulsraten zwischen 1×10^3 - 1×10^6 cpm zu erreichen, da nur diese im γ -Counter zuverlässig messbar sind, wurden Aktivitäten zwischen 1,85 MBq und 6,66 MBq in Abhängigkeit von der Applikationsform und dem Abtötungszeitpunkt verabreicht.

45 min bzw. 90 min nach Applikation des RIK wurden die Tiere wie in 3.10.6 beschrieben getötet. Blut, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Pankreas, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Peritoneum, Muskel, Knochen, Blase und ggf. Tumor wurden in γ -Probenröhrchen überführt, deren Taragewicht vorher bestimmt worden war. Um Masseveränderungen aufgrund von Feuchtigkeitsverlust zu verhindern, wurde das Gewicht sämtlicher Gewebe und Flüssigkeiten unverzüglich nach Entnahme mit einer Analysenwaage (Einteilung = 0,0001g; Meßfehler = 0,0002g) bestimmt. Von Blut und Leber wurden jeweils nur Anteile gemessen, weil andernfalls die hohe Aktivität jenseits des linearen Zählbereichs des γ -Counters gelegen hätte. Von Dickdarm und Dünndarm wurden jeweils etwa 2 cm ohne Mesenterium entnommen und die Ingesta durch Ausstreichen entfernt.

Die Messung der Aktivität erfolgte in einem γ -Counter (Wallac, Finnland). Dazu wurden in den Organproben 1 min lang die Zählraten der ^{213}Bi -markierten Antikörper bestimmt und in counts per minute (cpm) angegeben. Zur Auswertung wurden nur solche Zählraten herangezogen, die innerhalb des linearen Meßbereichs des γ -Counters (1.000-1.000.000 cpm) lagen. Diese cpm-Werte der Gewebeproben wurden auf Prozent der injizierten Aktivität pro g Gewebe normiert (%ID/g). Der 1% Referenz-Wert wurde wie folgt bestimmt: Die pro Tier injizierte Aktivität wurde ad 100 ml in PBS verdünnt und 1 ml davon im γ -Counter gemessen (5-fache Proben-Bestimmung). Für jedes Organ wurde der Mittelwert mit Standardabweichung errechnet.

3.10.4.2 Verteilung von freiem und MAK-gebundenem ^{213}Bi in der Niere

Mit Hilfe eines hochauflösenden digitalen Micro-Imagers (Biospace Measures, France) zur autoradiographischen Analyse wurde die Verteilung und Lokalisation von freiem und gebundenem ^{213}Bi in der Niere bestimmt. Dazu wurden 2 weiblichen NMRI nu/nu-Mäusen jeweils 4,44 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk bzw. ungebundenes ^{213}Bi in 875 μl PBS intraperitoneal gespritzt. 45 min nach Injektion wurden beide Mäuse euthanasiert, die jeweils rechte Niere und ein Stück aus dem M. quadriceps femoris entnommen. Die Organe wurden in Stickstoff verbracht, in Tissue Tek (Sakura, Niederlande) eingebettet und im Kryostat Microm HM 500 (Microm, Walldorf) 20 μm dicke Schnitte angefertigt. Jeweils 2 Schnitte der Niere mit freiem ^{213}Bi sowie der Niere mit ^{213}Bi -MAk wurden auf Superfrost plus Objektträger (Menzel, Braunschweig) gebracht, mit Szintillationsfolie (Decon Science Tec, Hohengandern) abgedeckt und in abwechselnder Reihenfolge in die Zählkammer des μ -IMAGER gebracht. Als Messungsstop wurde pro Schnitt 100.000 Counts gewählt.

3.10.5 Therapiestudien mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk und Mitomycin C

Für die Therapiestudien wurden Swiss nu/nu Nacktmäuse verwendet, denen zuvor 2×10^6 EJ 28-luc-Zellen intravesikal (3.10.3) instilliert wurden. Es wurden 8 Tiergruppen zu je 10 Mäusen gebildet. Die gewählte Aktivität für diese Therapiestudie basiert auf den vorangegangenen Versuchen zur Zytotoxizität des ^{213}Bi -Immunkonjugats (Klonogener Assay).

Die Therapie mit dem Radioimmunkonjugat ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk erfolgte mit zwei verschiedenen Aktivitäten von 0,37 MBq und 0,925 MBq in jeweils 100 μl PBS als intravesikale Instillation. Die Behandlung mit 0,925 MBq wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten 1 Stunde, 7 Tage und 14 Tage nach Zellinstillation und die mit 0,37 MBq 1 Stunde und 7 Tage nach Zellinstillation durchgeführt.

Als Kontrolle diente eine unbehandelte Tiergruppe, die anstelle des Radioimmunkonjugats nur 100 µl PBS intravesikal erhielt. Zwei Tiergruppen erhielten Mitomycin C (40 µg / 40 µl 0,9% NaCl) in Anlehnung an die humane Standardtherapie 1 Stunde sowie 7 Tage nach Zellinstillation. Die Einwirkzeit des Radiotherapeutikums, des Chemotherapeutikums sowie des PBS der Kontrollgruppe in der Blase betrug bei allen Gruppen 90 min, dieses entspricht ca. zwei Halbwertszeiten des ^{213}Bi , so dass davon ausgegangen werden kann, dass 75% des Radionuklids intravesikal zerfallen sind.

In Tabelle 2 sind die verschiedenen Therapiegruppen übersichtlich zusammengestellt. Der Beobachtungszeitraum der therapierten Gruppen und der Kontrollgruppe betrug 300 Tage, die Tiere wurden täglich auf Krankheitsanzeichen kontrolliert. Das Tumorstadium bzw. die Tumorstadium wurde 7 Tage nach Instillation von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK mittels Biolumineszenz-Imaging überwacht. Die Euthanasie der Tiere erfolgte gemäss der Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS bei beginnender Beeinträchtigung des Wohlbefindens der Tiere durch Urinretention, Aszites, Gewichtsverlust (>20% des KGW) und Tumorkachexie (GV-SOLAS, Merkblatt 73, 1999).

Tab. 2: Übersicht der Therapiegruppen mit intravesikal instillierten humanen Harnblasenkarzinom-Zellen (EJ 28-luc)

Zeitpunkt zwischen Zellinstillation und Therapie	Untherapierte Kontrolle	Intravesikal instillierte Aktivität in 100µl PBS		Intravesikal instilliertes Mitomycin C in 40µl 0,9% NaCl
1 h	PBS	0,37 MBq	0,925 MBq	40 µg
7 d	-	0,37 MBq	0,925 MBq	40 µg
14 d	-	-	0,925 MBq	-

3.10.6 Tötung und Sektion der Maus

Die Tötung der Tiere erfolgte nach Atemstillstand infolge der Betäubung mit CO₂ durch Eröffnung des Brustkorbs und Durchtrennung der Aorta im Bereich des Aortenbogens zum Entbluten der Organe.

Sektionen der Tiere wurden unmittelbar nach Eintritt des Todes durchgeführt um pathologische Vorgänge und morphologische Veränderungen zu dokumentieren und die besonders bei der Maus rasch eintretende Autolyse zu vermeiden. In dieser Studie wurden die Sektionen vorwiegend zur Organgewinnung durchgeführt, um zum einen die Verteilung der Radioimmunkonjugate zu messen und zum anderen die Organe (v. a. Nieren und Harnblase) auf makroskopisch erkennbare Schädigungen zu untersuchen und sie für die Immunhistochemie vorzubereiten. Die Organentnahme erfolgte nach dem Entbluten der Tiere in immer gleicher Reihenfolge.



Abb. 8: Sektionsfoto der weiblichen Maus vor Entnahme der Harnblase

3.11 Histologie

3.11.1 Herstellung von Kryostat-Gewebeschnitten

Mit relativ geringem Zeitaufwand lassen sich Kryostat-Gewebeschnitte herstellen, daher war diese Art der Gewebseinbettung sowohl für die Mikroautoradiographie im Micro-Imager mit ^{213}Bi wegen dessen kurzer HWZ als auch für die immunhistochemische Anfärbung des EGF-Rezeptors geeignet. Die Gewebe – in diesem Fall Niere und als entsprechendes Kontrollgewebe Muskel – wurden unmittelbar nach der Entnahme aus dem Tier in kalte physiologische NaCl-Lösung verbracht, anschliessend abgetupft, auf Objektträger eines Kryostaten (Microm Typ HN 500, Walldorf) mittels O.C.T. Compound (Tissue Tek®, Sakura Finetek, Niederlande) aufgefroren und bei -12°C Schnitte je nach Verwendungszweck zwischen $4\text{ }\mu\text{m}$ und $15\text{ }\mu\text{m}$ Dicke angefertigt. Mit gereinigten und silanisierten Objektträgern wurden die Gefrierschnitte aufgenommen und sofort weiterbearbeitet. Die luftgetrockneten Kryoschnitte wurden nach dem IHC-Protokoll (3.11.3) oder nach der Mikroautoradiographie nach dem H.E.-Protokoll (Tab. 3) gefärbt und mit Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

Tab. 3: Protokoll Hämalaun / Eosin-Färbung

Saures Hämalaun (nach Mayer)	1 min
Wässern in Leitungswasser (Bläuen)	5 min
Eosin wässrig (1 %)	30 sec
Aqua dest.	1 min
Lufttrocknen	20 min
Glyceringelatine	Je 5 min

3.11.2 Autoradiographie der Nierenschnitte mittels Micro-Imager

Autoradiographische Untersuchungen der Nierenschnitte wurden in dieser Studie mit dem Micro-Imager durchgeführt. Der μ -IMAGER™ (BIOSPACE Measures s.a., Paris) ist ein hochauflösendes digitales Messgerät zur Analyse und Erfassung Radionuklid-markierter Moleküle in histologischen Gewebeschnitten. Mittels dieser autoradiographischen Technik wurde die Lokalisation von freiem und AK-gekoppeltem ^{213}Bi in der Niere verglichen. Mit Hilfe dieses Verfahrens lassen sich Radionuklide in Gewebeschnitten lokalisieren. Die Messtechnik basiert auf einer Teilchenzählung und ist daher gleichermassen sensitiv für alle herkömmlichen β^- -Isotope wie beispielsweise ^3H , ^{125}I , ^{14}C und für β^+ -Isotope wie ^{18}F , ^{11}C , ^{124}I . ^{213}Bi zerfällt zu 2% unter Aussendung von α -Strahlung und zu 98% unter Aussendung von β^- -Strahlung und bietet somit ideale Voraussetzungen zur Messung im μ -IMAGER. Dieser kann in einer Messung bis zu 4 Proben analysieren, die benutzerdefiniert sequentiell ausgelesen werden können.

3.11.3. Immunhistochemischer Nachweis des EGF-Rezeptors

Die immunhistochemische Färbung des EGF-Rezeptors erfolgte nach der indirekten Methode. Dabei wird im ersten Schritt ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) gegen EGFR auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht. In einem zweiten Schritt wird ein Enzym-gekoppelter Sekundär-Antikörper, gerichtet gegen den Primärantikörper, aufgetragen. Das Enzym katalysiert die Farbentstehung nach Zugabe eines geeigneten Substrats. Als Primärantikörper wurde der humanisierte murine anti-EGFR-MAk EMD 72000 und als Sekundärantikörper ein polyklonaler Kaninchen anti-human IgG Ak, HRP (Horse Radish Peroxidase) konjugiert, verwendet. Durch die HRP-vermittelte Umsetzung des Substratchromogens DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) entsteht eine bräunliche Färbung. Alle im folgenden Protokoll angegebenen Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur.

IHC-Protokoll

Für die Immunhistochemie wurden 4 µm dicke Gefrierschnitte mit dem Kryostat (Microm, Typ HM 500, Microm, Walldorf) angefertigt, auf Objektträger (Superfrost® Plus, Menzel, Braunschweig) aufgezogen und für 30 min an der Luft getrocknet. Anschliessend wurden die Kryoschnitte für 10 min in -20 °C kaltem Aceton fixiert und danach 2 x 3 min in PBS gewaschen. Um Kreuzreaktionen mit endogenem IgG zu verhindern, wurden die Schnitte mit 5% Mausserum in PBS-BSA mit 0,1% Triton-X-100 und 0,05% Tween 20 für 30 min inkubiert. Nach Abklopfen der Blocking-Lösung wurde der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:40 mit PBS-BSA auf die Gewebeschnitte aufgebracht, dabei die Negativkontrollen ausgelassen und für eine Stunde inkubiert. Nach 2 x 2 min Waschung in PBS erfolgte das Blockieren der endogenen Peroxidase in einer Methanol-H₂O₂-Aqua dest.-Lösung (200:5:45) für 10 min. Wiederum wurden die Schnitte 3x2 min in PBS gewaschen und anschliessend der Sekundär-Antikörper in einer 1:80 Verdünnung mit PBS auf die Schnitte inklusive der Negativkontrollen aufgebracht und 30 min inkubiert. Nach 3 x 2 min Waschen in PBS wurde die DAB Peroxidase Substrat-Lösung aufgetragen, 10 min inkubiert und danach 5 min in Leitungswasser gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin für 45 sec und sofortigem Bläuen in Leitungswasser für 5 min. Anschliessend wurden die Schnitte getrocknet und mit Kayser's Glycerin-Gelatine eingedeckt.

3.12 Statistik der Überlebensdaten

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des SigmaPlot-Programms (Systat, Erkrath) und der SPSS-Software (Version 16.0, SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Die Überlebensdaten aus den Therapiestudien wurden über einem Zeitraum von 300 Tagen nach erfolgter Therapie erfasst und der Median der Überlebenszeiten der Tiere im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe in Tagen ermittelt. Die gewonnenen Daten wurden in Kaplan-Meier-Diagrammen dargestellt.

Tiere, die länger als 300 Tage überlebten, wurden zensiert und in der statistischen Analyse mit „>300“ angegeben. Zur Beschreibung der Streuung von Daten wurde der Interquartilsabstand (IQA) verwendet, der als Abstand zwischen dem ersten und dem dritten Quartil (25. bis 75. Perzentil) definiert ist. Da beide Quartile nicht von Ausreißern beeinflusst werden können, ist der Interquartilsabstand ein robustes Streuungsmaß. Er zeigt an, in welchem Wertebereich die 50% der Werte liegen, die sich zu gleichen Teilen um den Median als Zentrum der Verteilung anordnen. Die Vergleiche der Überlebenskurven und die Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde mittels des log-rank-test durchgeführt.

Als „hochsignifikant“ wurden Werte mit Signifikanzniveau $p < 0,01$, als „signifikant“ Werte mit $p < 0,05$ definiert.

„Der Intellekt hat ein scharfes Auge für Methoden und Werkzeuge, aber er ist blind gegen Ziele und Werte.“

Albert Einstein

4. ERGEBNISSE

4.1 Markierung der Antikörper mit ^{213}Bi

Die Markierung der Anti-EGFR-, Anti-MUC1- und Anti-EpCAM-Antikörper erfolgte nach den unter 3.4.1.2 und 3.4.1.3 beschriebenen Methoden. Zu Beginn des Markierungsvorgangs wurden jeweils 100 µg des chelatierten Antikörpers in das ^{213}Bi -Eluat mit Aktivitäten von 41 MBq – 314 MBq pipettiert. Nach 7 Minuten wurden dabei bis zu 97% des ^{213}Bi gebunden. Nach Abtrennung von nicht gebundenem ^{213}Bi mittels Gelfiltration über eine PD-10 Säule lagen nahezu 99% des ^{213}Bi gebunden am Antikörper vor.

Bei Einsatz von 100 µg Anti-MUC1-MAK bzw. Anti-EpCAM-MAK betrug die Markierungsausbeute 81% bzw. 96%. Nach der Passage über eine PD-10 Säule waren 95% bzw. 98% des ^{213}Bi an die Antikörper gebunden. Es ergaben sich spezifische Aktivitäten (Akt./µg AK) der ^{213}Bi -markierten Antikörper bei Anti-EGFR-MAK von 0,35 MBq bis 1,4 MBq/µg AK, bei Anti-MUC1-MAK von 0,23 MBq bis 1,3 MBq/µg AK und bei Anti-EpCAM-MAK von 0,08 MBq bis 0,61 MBq/µg AK.

Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht eines Antikörpers von 150 kDa entspricht 1 µg Antikörper etwa 4×10^{12} Molekülen. 1 MBq ^{213}Bi sind 4×10^9 ^{213}Bi -Atome. Mit Hilfe der spezifischen Aktivität lässt sich somit berechnen, wie viele der eingesetzten Antikörpermoleküle mit ^{213}Bi markiert sind. So entspricht eine spezifische Aktivität von 0,35 MBq/µg AK einer Markierung von einem von 2857 anti-EGFR-MAK; eine spezifische Aktivität von 1,4 MBq/µg AK von einem von 714 eingesetzten anti-EGFR-MAK. Die Immunreaktivität der verwendeten Antikörper wird durch die ^{213}Bi -Markierung nicht beeinträchtigt, falls die Anzahl der pro Antikörper gekoppelten CHX-A''-DTPA Chelate 3-5 nicht übersteigt (Milenic et al., 2001; Fischer, 2001).

4.2 Charakterisierung der verwendeten Harnblasenkarzinom-Zelllinien

4.2.1 Proliferation der Zellen in vitro

Bei den in den Versuchen verwendeten Zellen handelt es sich um etablierte Urothelkarzinom-Zelllinien, die alle als Monolayer, das heisst adhärent, wachsen.

Nachdem die jeweilige Zelllinie in Kultur gebracht wurde, konnte zunächst ein verzögertes Wachstum der Zellen beobachtet werden, die sogenannte lag-phase, die sich auf Stunden beschränken, aber auch einige Tage dauern kann. Anschliessend folgte eine logarithmische Wachstumsphase der Zellen, die alle 2-3 Tage zu konfluierendem Zellrasen führte, welches ein Aufteilen in neue Kulturflaschen notwendig machte. Die Verdopplungszeit für die Zelllinie EJ 28 ist beschrieben und beträgt ca. 24 h (Krämer, 2005).

Die Zellen der Linie 647 V aggregierten während des Wachstums zu adhärenen Zellclustern in Monolayern, sie zeigte ein wesentlich langsames Wachstum als die anderen 4 Zelllinien. Von dieser Zelllinie wird eine Expression des MUC-1, MUC-2 und MUC-7-Rezeptors beschrieben (Retz et al., 1998). Die Zellen der Linien EJ 28, RT 112, T 24 und J 82 zeigten in Kultur ein epithelial adhärenes Wachstum in Monolayern.

Eine erfolgreiche stabile Transfektion der Zelllinie EJ 28 mit Firefly (*Photinus pyralis*) Luciferase konnte in anschliessenden in vitro-Biolumineszenz Aufnahmen (4.2.4) validiert werden. Zudem zeigte sich, dass die Transfektion von EJ 28 keinen Einfluss auf das in vitro-Proliferationsverhalten der Zelllinie nahm und in nachfolgenden Bindungs- und Internalisierungsstudien auch nicht die Bindung des ²¹³Bi-anti-EGFR-MAk an seinen Rezeptor beeinträchtigte.

4.2.2 Bindung des Radioimmunkonjugates an die Zelllinien

Die Ergebnisse der unter 3.6 beschriebenen Versuche zur Bindungsspezifität der drei ^{213}Bi -Immunkonjugate sind in Abb. 9 als Balkendiagramm dargestellt. Dabei wurde die Bindung der drei ^{213}Bi -markierten Antikörper Anti-EGFR, Anti-EpCAM und Anti-MUC1 an die 5 Zelllinien 647 V, RT 112, T 24, J 28, EJ 28 bei 37°C Inkubationstemperatur erfasst, sowie in nachfolgenden Diagrammen ein Vergleich der Bindungswerte von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAK und ^{213}Bi -Anti-MUC1-MAK bei einer Inkubationstemperatur von 37° und 4° Grad C mit allen 5 Zelllinien dargestellt (Abb. 10 + 11).

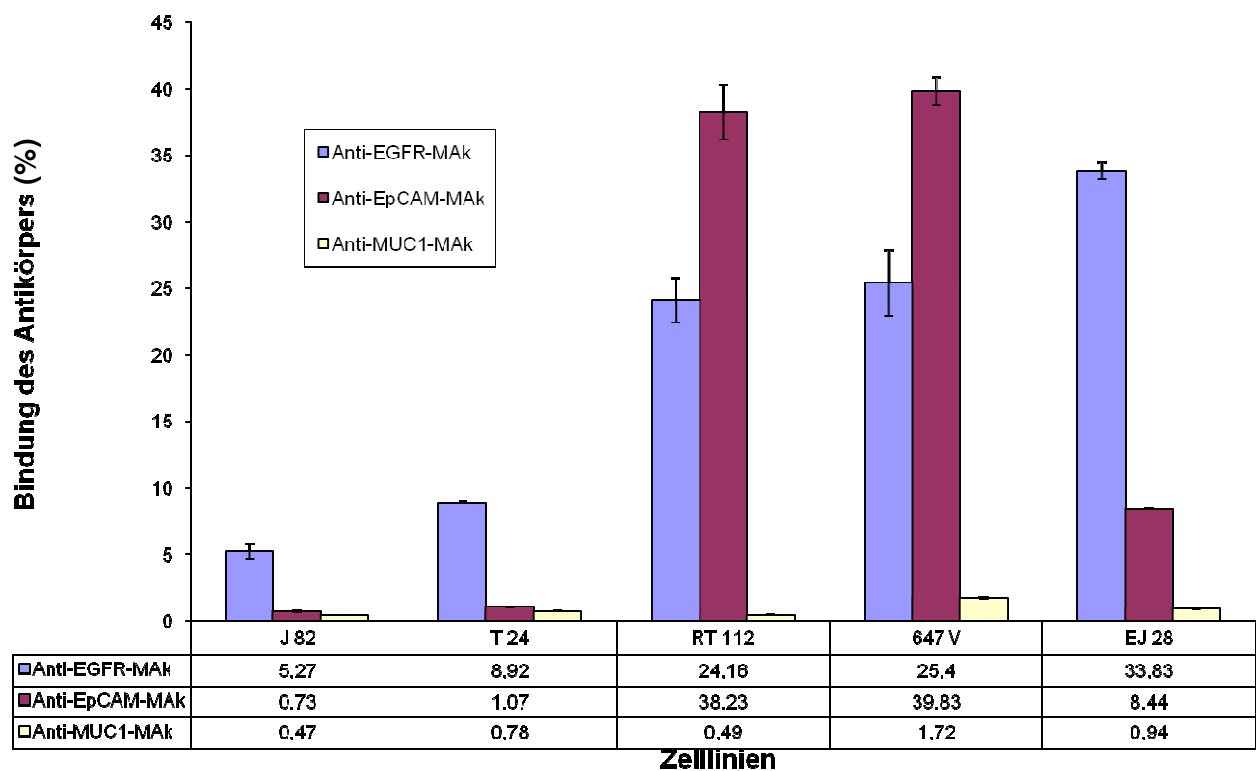


Abb. 9: Bindung der drei ^{213}Bi -markierten Antikörper an die 5 unterschiedlichen Harnblasenkarzinom-Zelllinien (%)

Die Zelllinie EJ 28 zeigte mit dem ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk die höchste Bindung von 33,8%. Noch höher lagen die Bindungswerte des ^{213}Bi -anti-EpCAM-MAk mit den Zelllinien RT 112 (38,2%) und 647 V (39,8%), für weitere Versuche wurde jedoch die Zelllinie EJ 28 und das RIK ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk ausgewählt, da alle getesteten Zelllinien den EGF-Rezeptor exprimieren und von diesen EJ 28 die höchste EGFR-Expression zeigte. Die Bindung des Anti-MUC1-MAk lag bei allen Zelllinien weit unter 2%, von daher kann dieser Antikörper für die in dieser Studie verwendeten Zelllinien als unspezifischer Antikörper bezeichnet werden.

Die Diagramme der Abb. 11 und 12 zeigen die Bindung des spezifischen Anti-EGFR-MAk im Vergleich zum unspezifischen Anti-MUC1-MAk bei Inkubationstemperaturen von 37° und 4°C.

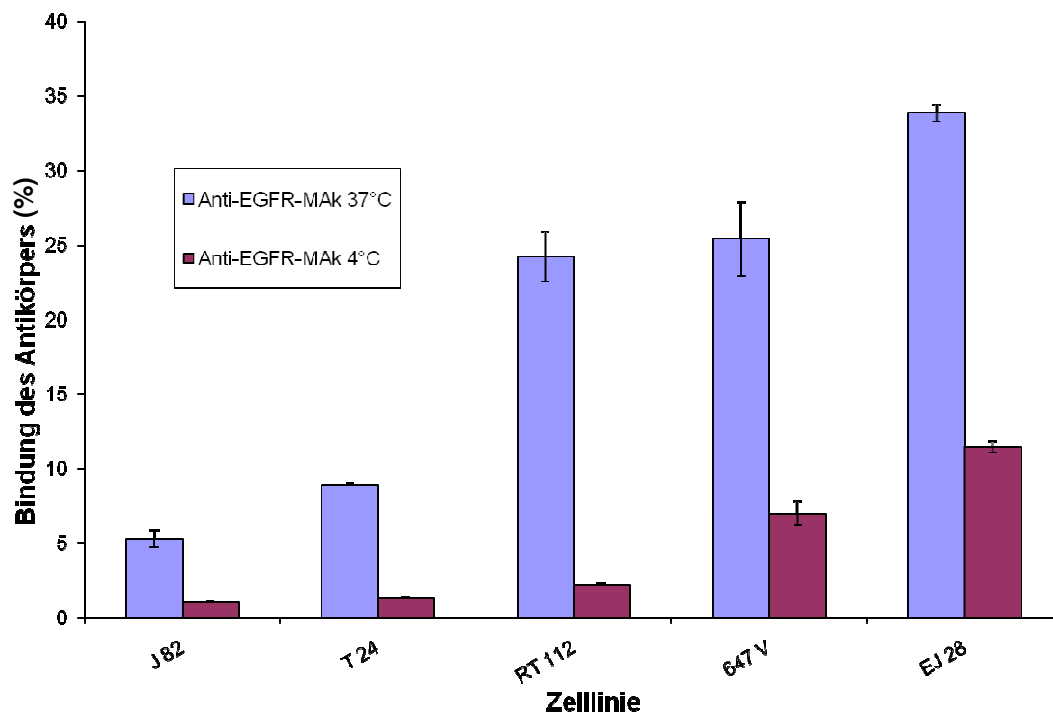


Abb. 10: Bindung des Anti-EGFR-MAk bei Inkubationstemperaturen von 37° und 4°C an die 5 unterschiedlichen Harnblasenkarzinom-Zelllinien (%)

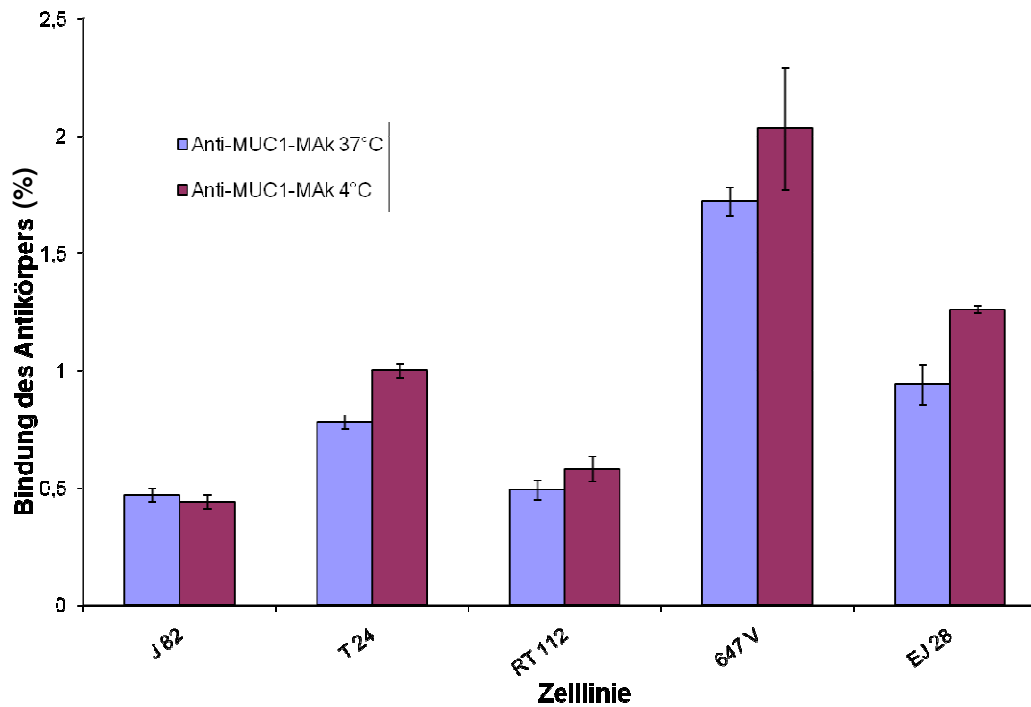


Abb. 11 Bindung des Anti-MUC1-MAk bei Inkubationstemperaturen von 37° und 4°C an die 5 unterschiedlichen Harnblasenkarzinom-Zelllinien (%)

Anti-EGFR-MAk zeigt bei Inkubationstemperaturen von 4°C eine deutlich schlechtere Bindung von 1% (J 82) - 11,6% (EJ 28) 37°C, während der unspezifische Antikörper Anti-MUC1 bei 4°C zwar eine geringfügig höhere Bindung aufweist, insgesamt jedoch bei allen getesteten Zelllinien keine Werte über 2% erreicht.

Die folgende Tab. 4 listet die Bindung in % für alle getesteten Zelllinien übersichtlich auf.

Tab. 4: Übersicht der ermittelten Werte der Bindungsstudien (%). Angegeben sind Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD).

	Anti-EGFR-MAk 37°C	Anti-EGFR-MAk 4°C	Anti-MUC1-MAk 37°C	Anti-MUC1-MAk 4°C	Anti-EpCAM-MAk 37°C
	MW±SD	MW±SD	MW±SD	MW±SD	MW±SD
J 82	5,27±1,15	1,06±0,08	0,47±0,06	0,44±0,06	0,73±1,13
T 24	8,92±0,12	1,27±0,08	0,78±0,06	1,0±0,06	1,07±0,04
RT 112	24,2±3,39	2,22±0,17	0,49±0,07	0,58±0,11	38,2±4,12
647 V	25,4±4,99	6,95±1,64	1,72±0,12	2,03±0,52	39,8±2,10
EJ 28	33,8±1,15	11,5±0,84	0,94±0,17	1,26±0,03	8,44±0,05

4.2.3 Quantifizierung der EGF-Rezeptorexpression mittels Scatchard-Analyse

Mit der unter 3.7 beschriebenen Analyse nach Scatchard wurde die EGF-Rezeptorexpression der Zelllinien RT 112 und EJ 28 quantifiziert. Diese beiden Zelllinien zeigten gemeinsam mit der Zelllinie 647 V in den Bindungsstudien die höchsten Bindungswerte mit dem Anti-EGFR-MAk. Da jedoch 647 V ein deutlich langsames Wachstum in vitro zeigte, wurde die Anzahl der EGFR-Moleküle pro Zelle nur bei den Linien RT 112 und EJ 28 bestimmt.

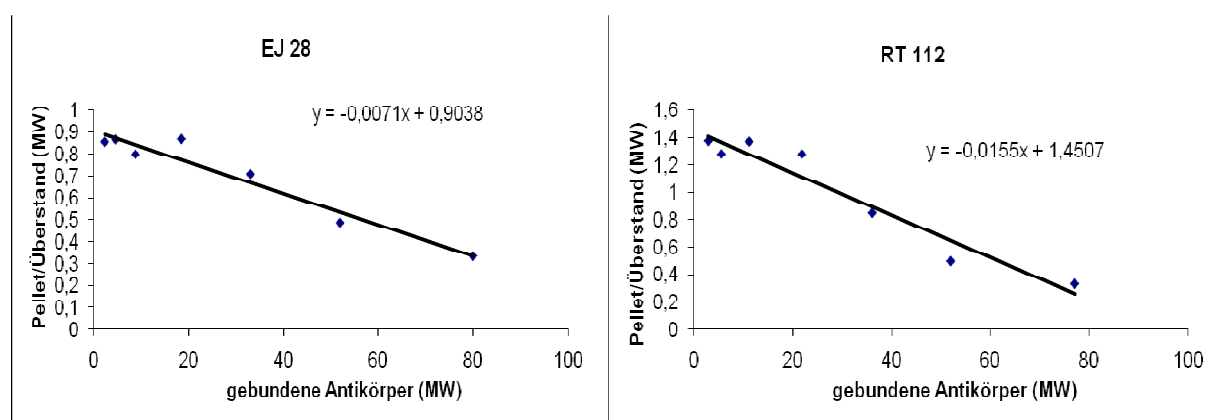


Abb. 12: Grafische Darstellung der Scatchard-Analysen der Zelllinien EJ 28 und RT 112 zur Ermittlung der EGF-Rezeptordichte pro Zelle

Mit diesem Verfahren konnten auf 1×10^6 EJ 28 Zellen $5,09 \times 10^{11}$ EGF-Rezeptoren nachgewiesen werden, dies bedeutet eine Antigendichte von 509.183 EGF-Rezeptoren pro EJ 28-Zelle. Die Dissoziationskonstante (K_d) des Anti-EGFR-MAK zu seinem Rezeptor betrug bei der Zelllinie EJ 28 0,95 nM ($9,5 \times 10^{-8}$ mol/l). Bei der Zelllinie RT 112 zeigte sich eine geringere Antigendichte von 382.374 EGF-Rezeptoren pro Zelle und es ergab sich eine K_d von 0,43 nM ($4,3 \times 10^{-8}$ mol/l).

4.2.4 In vitro Biolumineszenz-Imaging und klonogener Assay nach Inkubation der Zelllinie EJ 28-luc mit dem Radioimmunkonjugat

Eine erfolgreiche stabile Transfektion der Zelllinie EJ 28 mit Firefly (*Photinus pyralis*) Luciferase konnte in einem in vitro-Test, bei dem zu den in unterschiedlichen Zellzahlen (1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 und 1×10^5) in 96-well-plates ausgesäten EJ 28-luc 10 μ l Luciferin (15 mg/ml) zugegeben wurde, bestätigt werden. Die im Optical Imaging mit einem deutlichen Signal darstellbare Zellzahl lag bei EJ 28-luc bei 1×10^4 Zellen / 200 μ l, mit einem schwachen Signal konnte bereits eine Zellzahl von 1×10^3 / 200 μ l dargestellt werden.

Klonogener Assay mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAK-Therapie:

Die aus dem Vorversuch zum klonogenen Assay ermittelte einzusetzende Zellzahl für die Zelllinie EJ 28 betrug 100 Zellen pro ml Medium und führte zur Bildung von 52,6 Zellkolonien (MW aus $n = 6$).

Die Analyse der Zytotoxizität des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK zeigte eine Abhängigkeit des Zellüberlebens in Abhängigkeit von der eingesetzten ^{213}Bi -Aktivität. So bildeten sich in der mit PBS befüllten Kontrollplatte im Durchschnitt ($n = 6$) 55 Klone (100%) pro well, in der mit 0,37 MBq behandelten Platte reduzierte sich die Klonbildung auf 24%, eine Behandlung mit 0,74 MBq reduzierte das Zellüberleben auf 5,5% und eine Behandlung mit 1,48 MBq verringerte die Klonbildung auf 0,4%. Die minimale Aktivitätskonzentration mit letaler Wirkung auf die Zellen lag bei 1,35 MBq / ml.

4.2.5 Grad der Internalisierung des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk

Die Internalisierungskinetik wurde, wie unter 3.7 beschrieben, mit dem spezifischen ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk und dem unspezifischen ^{213}Bi -anti-MUC1-MAk an EJ 28-luc Zellen 10, 30 und 60 min nach Bindung des Radioimmunkonjugats bestimmt.

Anti-EGFR-MAk zeigte bei diesem Versuch im Mittel eine Bindung von 39% der eingesetzten AK-Menge ($250 \text{ ng}/3 \times 10^6$ Zellen), während Anti-MUC1-MAk mit 1,5% der eingesetzten AK-Menge ($820 \text{ ng}/3 \times 10^6$ Zellen) eine deutlich schlechtere Bindung aufwies (Tab. 5).

Tab. 5: Bindungs- und Internalisierungskinetik von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk und ^{213}Bi -anti-MUC1-MAk. Bindung (%): Anteil des gebundenen Antikörpers; Internalisierung (%): Internalisierter Antikörper bezogen auf 100% Bindung zu den Zeitpunkten 10, 30 und 60 min.

Anti-EGFR-MAk

Zeitpunkt (min)	Bindung (%) MW \pm SD (n=2)	Bindung (ng AK) MW \pm SD (n=2)
10	39,1 \pm 0,56	97,7 \pm 1,47
30	39,1 \pm 0,22	97,8 \pm 0,54
60	38,6 \pm 2,21	96,5 \pm 5,53

Zeitpunkt (min)	Internalisierung (%) MW \pm SD (n=2)	Internalisierung (ng AK) \pm SD (n=2)
10	37,9 \pm 0,37	37,1 \pm 0,19
30	40,5 \pm 0,87	39,6 \pm 0,63
60	45,2 \pm 0,68	43,6 \pm 1,84

Anti-MUC1-MAk

Zeitpunkt (min)	Bindung (%) MW \pm SD (n=2)	Bindung (ng AK) MW \pm SD (n=2)
10	1,20 \pm 0,49	9,8 \pm 4,05
30	1,86 \pm 0,50	15,2 \pm 4,12
60	1,41 \pm 0,54	11,5 \pm 4,40

Zeitpunkt (min)	Internalisierung (%) MW \pm SD (n=2)	Internalisierung (ng AK) \pm SD (n=2)
10	74,1 \pm 15,40	7,6 \pm 4,52
30	72,9 \pm 19,46	11,5 \pm 5,97
60	66,8 \pm 8,04	7,9 \pm 3,87

Mit zunehmender Inkubationszeit nahm die Internalisierung des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk von 37% (10 min) auf 45% (60 min) der zellmembrangebundenen AK-Menge (=100%) zu. Trotz einer wesentlich schlechteren Bindung an EJ 28-luc Zellen internalisierte der unspezifische ^{213}Bi -anti-MUC1-MAk besser (74% nach 10 min, 67% nach 60 min) (Tab. 5). Die Menge des internalisierten ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk lag im Mittel jedoch mit 40 ng signifikant höher ($p < 0,01$) als die des unspezifischen ^{213}Bi -anti-MUC1-MAk (9 ng) (Abb. 13).

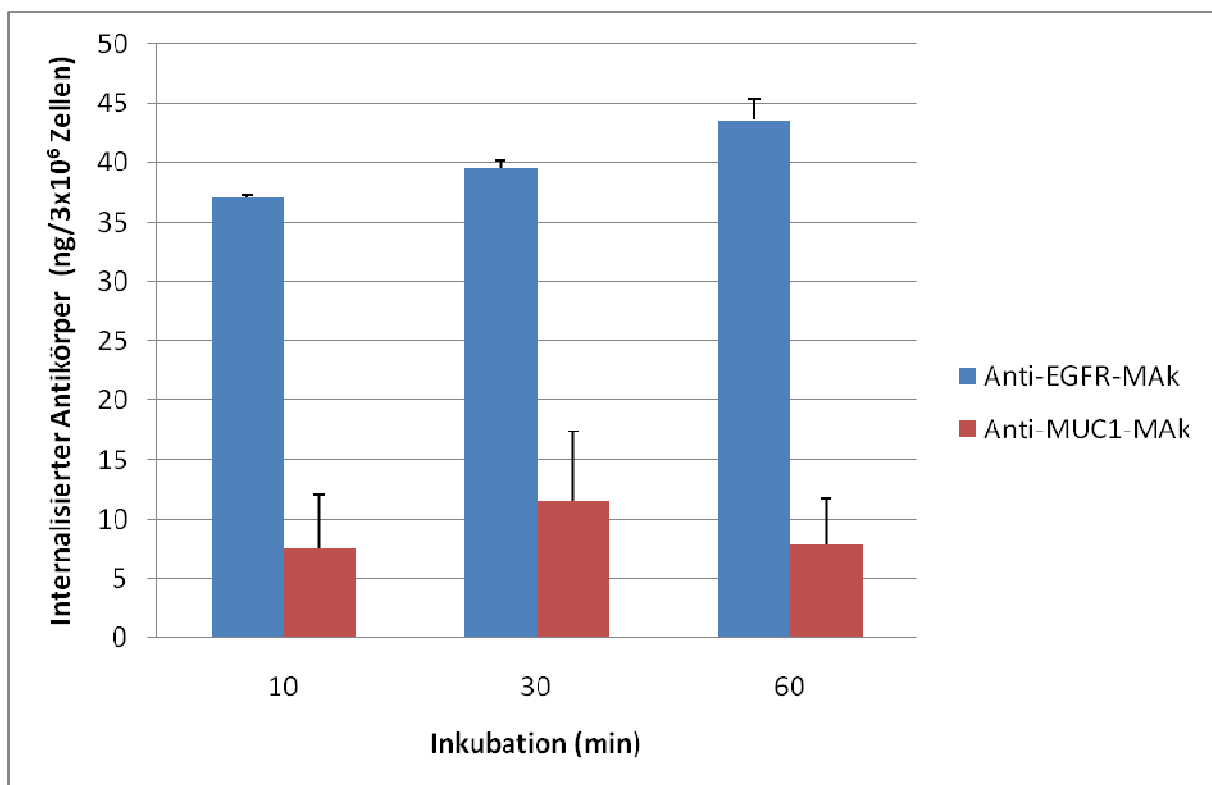


Abb. 13: Internalisierungskinetik des spezifischen ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk und des unspezifischen ^{213}Bi -anti-MUC1-MAk bei EJ 28-luc Zellen (ng / 3×10^6 Zellen)

4.3 Tierexperimente

4.3.1 Etablierung des Harnblasenkarzinoms

Nach Vorbereitung der Maus zur orthotopen Xenotransplantation des Urothelkarzinoms (3.10.3) wurde EJ 28-luc in zwei unterschiedlichen Zellkonzentrationen (5×10^4 und 2×10^6 Zellen / 100 μ l RPMI-Medium) in die murine Blase instilliert. Mittels Optical Imaging wurde eine erfolgreiche Tumorimplantation überprüft.

Die Instillation der höheren Zellkonzentration von 2×10^6 führte bei 80% der Tiere zu einem erfolgreichen Xenotransplantat, während der Einsatz von 5×10^4 Zellen lediglich bei 20% der Tiere zu einer Tumorausbildung führte. Die xenotransplantierten Tiere wurden täglich auf das Wohlbefinden überprüft und bei Ausbildung von tumorbedingten Krankheitszeichen euthanasiert. Die Überlebenszeit der tumortragenden Tiere lag unabhängig von der eingesetzten Zellzahl zwischen 20 und 69 Tagen post Zellinstillation. Dies ergab eine mediane Überlebenszeit von 42 d nach Zellinstillation ($n = 10$). Darauf folgende Sektionen zeigten, dass die Ausbildung von Krankheitszeichen weniger von der Grösse des Tumors abhängig war als von der Lage des Karzinoms.



Abb. 14: Sektionsfotos tumortragender Nacktmäuse: a) Blase mit deutlicher Gefässeinsprossung 14 d nach Zellinstillation; b) intravesikales Tumorwachstum 28 d nach Zellinstillation

Die Lage des Tumors am Blasenausgang führte in kurzer Zeit zur Urethraobstruktion und nachfolgend zu Urämie durch Harnretention mit Rückstau in die Nieren. Etablierte sich der Tumor am Blasendach oder an der lateralen Blasenwand, war ein ausgedehnteres Tumorwachstum möglich, bei dem Krankheitsanzeichen erst später deutlich wurden (Abb. 14 b). Diese Tumoren konnten durch die Bauchdecke palpiert werden. Eine Mikrohämaturie konnte am ersten Tag nach Zellinstillation nachgewiesen werden. Bei erfolgloser Xenotransplantation sistierte sie nach 5-7 Tagen, bei sich etablierenden Tumoren blieb sie bestehen.

4.3.2 In vivo-Darstellung der Tumorentwicklung

4.3.2.1 Sonographie

Mittels Sonographie konnte ein Tumorwachstum frühestens ab dem 18. Tag nach Zellinstillation dargestellt werden. Mit Hilfe einer 13,5 MHz-Sektorsonde waren auch gering gefüllte Blasen schnell detektierbar und konnten systematisch durchgemustert werden. In Abb. 15 a und b sind Longitudinalschnitte der murinen Blase dargestellt, Abb. 15 a zeigt einen Tumor (echogene weisse Struktur ins dunkle, echoarme Blasenlumen hervorwölbbend) 18 d nach Zellinstillation, in Abb. 15 b ist vergleichend eine gesunde, unbehandelte Blase zu sehen.

Aufgrund von Artefakten bei der Aufnahme durch echogene gasgefüllte Darmschlingen, erkennbar in Abb. 15 b an der Schallauslöschung unmittelbar unterhalb der Artefakte (Pfeile), kam es jedoch regelmässig zu falsch positiven Resultaten in der Tumordiagnostik, sobald Darmschlingen den Blasenbereich überlagerten.

Durch die ständige Magen-Darm-Motorik und die damit verbundenen Überschneidungen erwies sich die Ultraschalldiagnostik im Hinblick auf eine zuverlässige frühestmögliche Darstellung des Tumors als schwierig, während Tumore in einem späteren Wachstumsstadium deutlich darstellbar waren. Der Vorteil dieser in vivo-Diagnostik lag in der schmerzfreien Untersuchung, die eine zusätzliche Belastung der Tiere durch eine Narkose nicht notwendig machte.

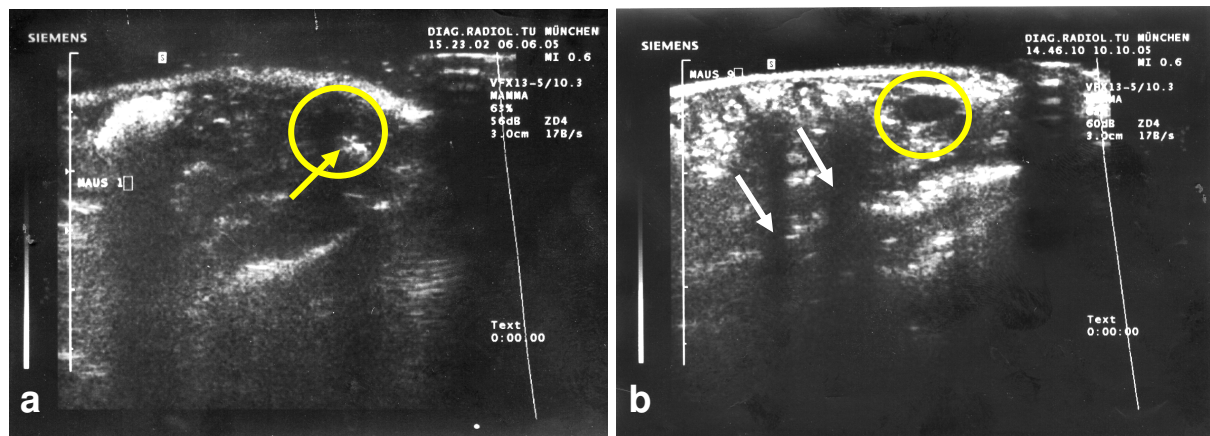


Abb. 15: Sonographieaufnahmen: a) Harnblase mit Tumor (gelber Pfeil) auf Höhe des Blasenausgangs 18 d p Zellinstillation (Kreis), b) Blase einer unbehandelten Maus (Kreis), Schallauslöschung unterhalb gasgefüllter Darmschlingen (weisse Pfeile)

4.3.2.2 Biolumineszenz-Imaging

Mittels Biolumineszenz Imaging konnte in vitro eine Zahl von 1×10^4 EJ 28-luc Zellen bei Belichtungszeiten von 60 und 90 sec zuverlässig dargestellt werden (4.2.4). Ebenfalls sichtbar waren 1×10^3 Zellen, jedoch nur mit einem schwachen Signal bei 90 sec Belichtungszeit im schwarz-weiss-Modus. Eine Transformation in „Pseudo-Colors“ war bei diesem schwachen Signal nicht möglich, dennoch lieferte diese geringe Zahl von 1×10^3 EJ 28-luc Zellen im schwarz-weiss-Modus Hinweise auf eine erfolgreiche Etablierung des Tumors in vivo.

Die in vivo-Darstellung des xenotransplantierten Tumors im Optical Imaging aus verschiedenen Aufnahmepositionen ergab aufgrund der anatomischen Lage der murinen Harnblase eine deutlich bessere Darstellung von ventral als von lateral bzw. dorsal. Aufnahmen von lateral und dorsal lieferten erst im Verlauf des Tumorwachstums (ab d 21 p. Zellinstillation) Hinweise auf die Lage des Tumors. Abb. 16 zeigt die unterschiedlichen Aufnahmepositionen tumortragender Mäuse.

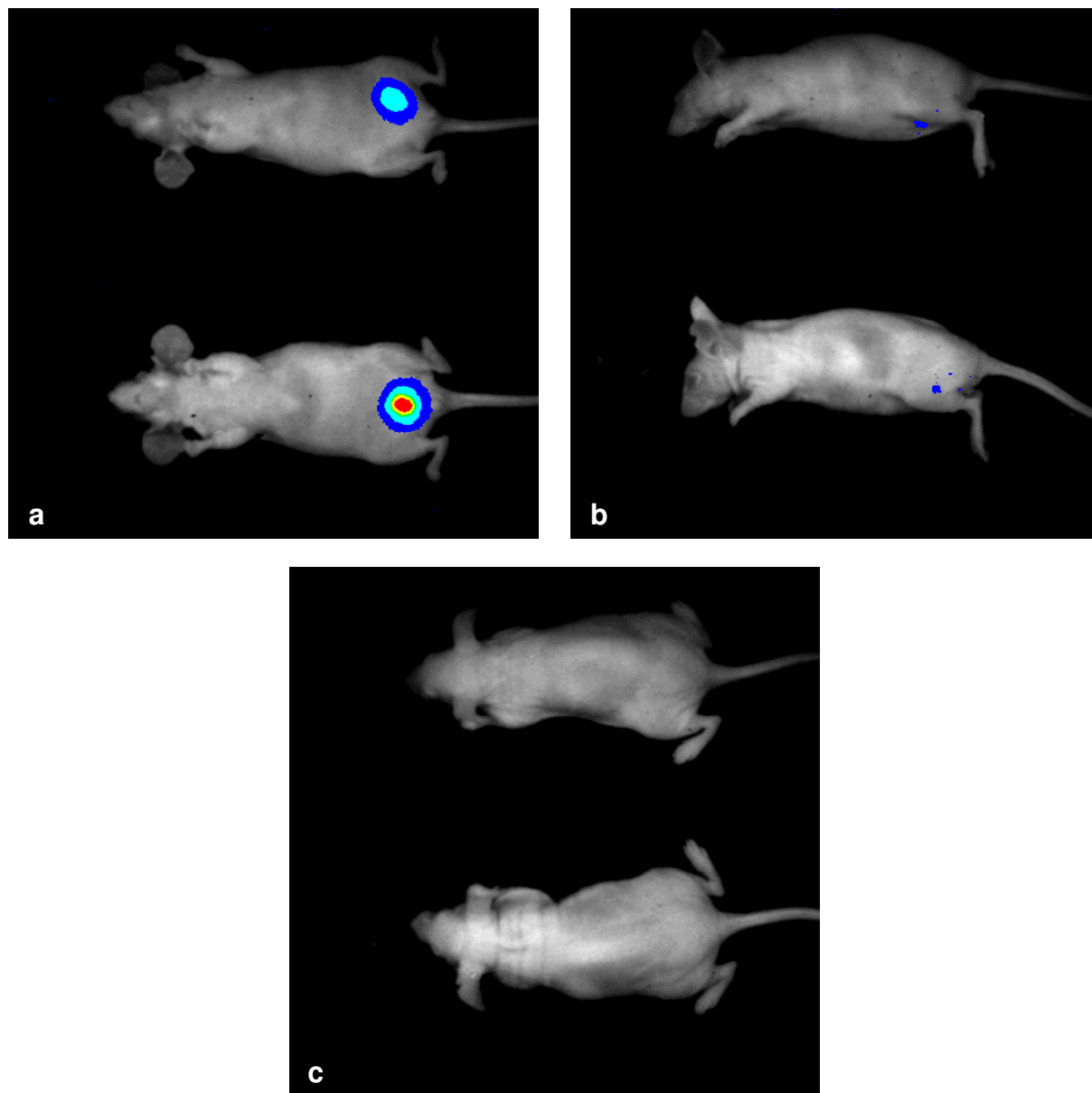


Abb. 16: Biolumineszenzaufnahmen: Zwei tumortragende Mäuse jeweils 21 d nach Zellinstillation in verschiedenen Aufnahmepositionen, a) ventral, b) lateral, c) dorsal

Die Aufnahmen zur Erfassung des Tumorwachstums erfolgten einmal wöchentlich unter Ketamin / Xylazin-Narkose. Ein erfolgreiches Anwachsen der Tumorzellen war schon ab Tag 7 nach Tumorzell-Inokulation mittels Biolumineszenz-Imaging nachweisbar (Abb 17 a-d).

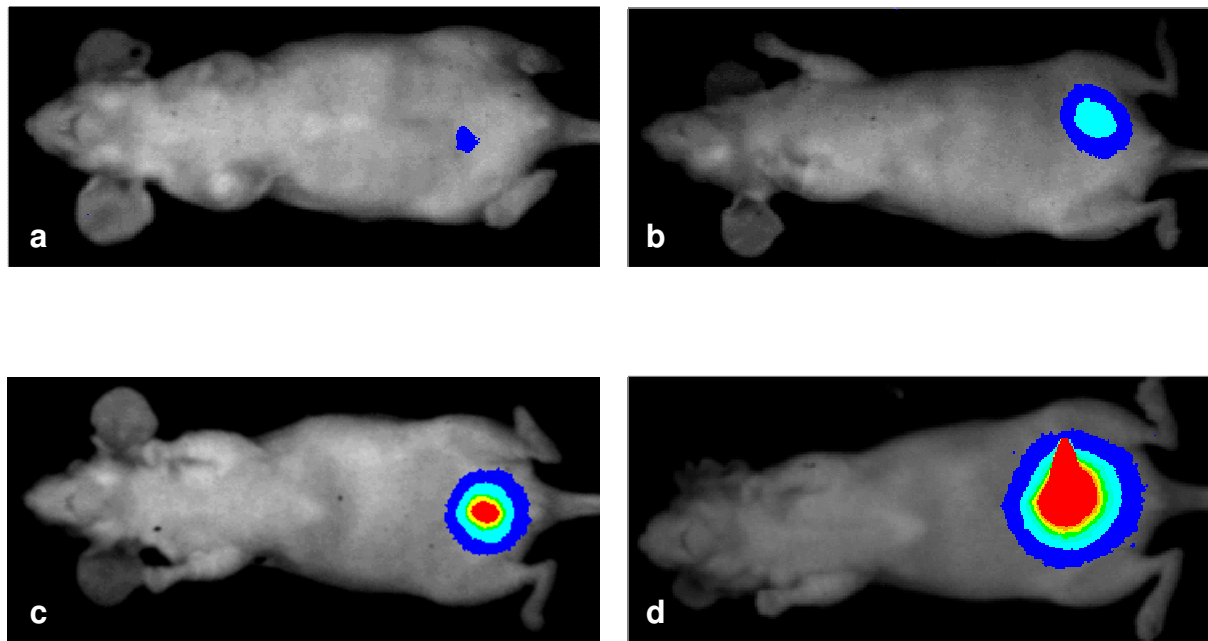


Abb. 17: Biolumineszenzaufnahmen: Erfassung der Tumorentwicklung a) 7 Tage; b) 14 Tage; c) 21 Tage; d) 28 Tage nach Zellinstillation

Biolumineszenz-Imaging aus ventraler Aufnahme position ermöglichte eine frühzeitige und zuverlässige Darstellung der Entwicklung erfolgreicher Xenotransplantate in der murinen Harnblase. Somit verspricht dieses bildgebende Verfahren eine tierschonende in vivo-Kontrolle der Tumorentwicklung sowie der therapeutischen Effizienz des instillierten RIK.

4.3.2.3 ^{11}C -Cholin PET

Die PET-Aufnahmen erfolgten im dynamischen Modus unmittelbar nach Injektion des ^{11}C -Cholin in die Schwanzvene. Bereits 1 min nach i.v. Injektion konnte eine Anreicherung des ^{11}C -Cholin in Leber, Nieren und Blase nachgewiesen werden (Abb. 18 a-c).

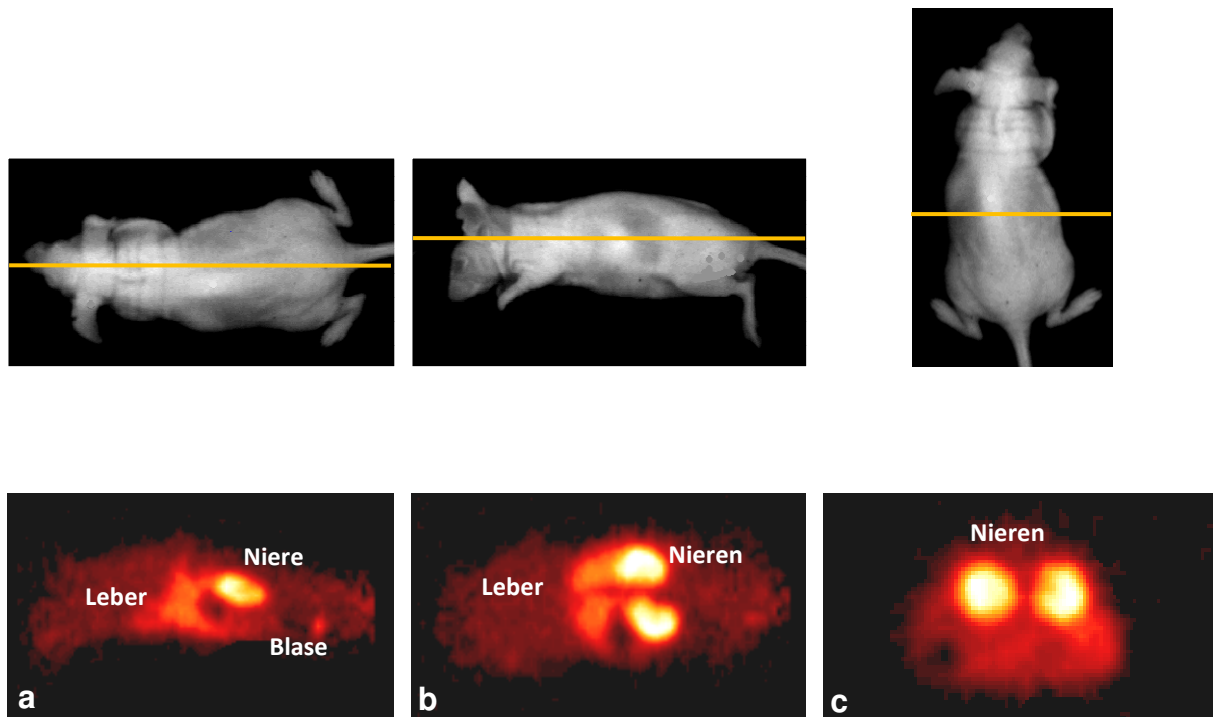


Abb. 18: Tumortragende Maus 28 d nach Zellinstillation, PET-Aufnahmen 1 min nach i.v. Injektion von 10,5 MBq ^{11}C -Cholin a) Sagittalschnitt; b) Coronarschnitt; c) Transversalschnitt (gelbe Linien entsprechen den Schnittebenen)

Mit ^{11}C -Cholin konnte kein Unterschied zwischen einer tumortragenden (28 d p. Zellinstillation) und einer Kontrollmaus dargestellt werden (Abb. 20 a und b). Jeweils in der ersten Minute nach Injektion des Tracers konnte eine Anreicherung sowohl in der tumortragenden als auch in der gesunden Blase nachgewiesen werden, so dass jeglicher Rückschluss auf ein mögliches Tumorwachstum ausgeschlossen war.

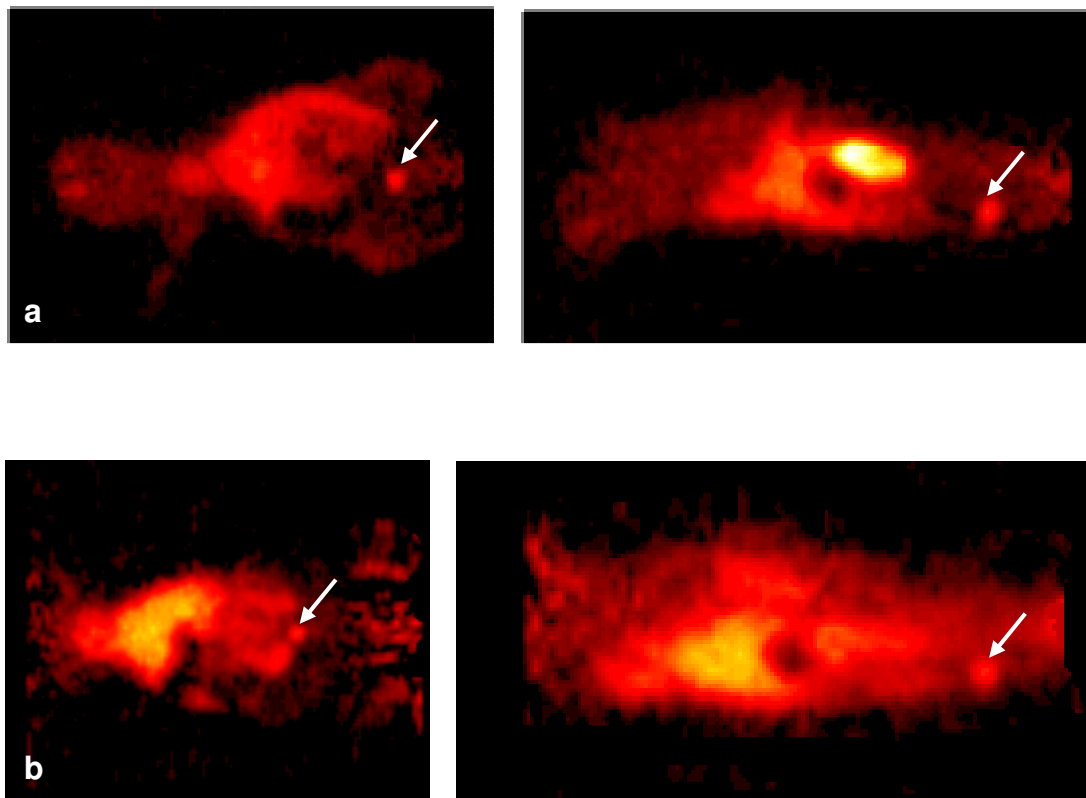


Abb. 19: PET-Aufnahme einer a) tumortragenden Maus und b) einer Kontrollmaus, weisse Pfeile zeigen auf die Blase, jeweils links Coronar- und rechts Sagittalschnitt

4.3.3 Bioverteilung des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk im murinen Organismus nach intravenöser und intravesikaler Applikation

Um die Verteilung des Radioimmunkonjugates im murinen Organismus zu messen, wurden unterschiedliche Applikationsformen (i.v. und intravesikal) gewählt und die Biodistributionsstudie sowohl an tumortragenden Tieren als auch an gesunden Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion des RIK durchgeführt. Zunächst wurde die Verteilung nach i.v. Injektion von 2,96 MBq des RIK an tumortragenden Mäusen 45 min nach Injektion untersucht.

Die intravesikale Instillation erfolgte an gekauterten und an unbehandelten Mäusen mit Aktivitäten zwischen 1,85 MBq und 6,66 MBq, die Untersuchung der Biodistribution erfolgte 45 min und 90 min nach Instillation. Die jeweilige Anreicherung in den Organen, angegeben in % der applizierten Aktivität pro Gramm Gewebe (% inj. Akt./g) zeigen die Abb. 20-22.

Nach intravenöser Applikation des RIK zeigte sich 45 min nach Injektion die höchste Aktivitätskonzentration im Blut (32,3% inj. Akt./g) und in allen Organen mit starker Blutversorgung wie Herz (9,2% inj. Akt./g), Lunge (11,5% inj. Akt./g), Leber (11,6% inj. Akt./g), Niere (8,4% inj. Akt./g) und Milz (4,9% inj. Akt./g). Ebenso konnte eine Anreicherung im EGFR-überexprimierenden Urothelkarzinom (3,6% inj. Akt./g) beobachtet werden.

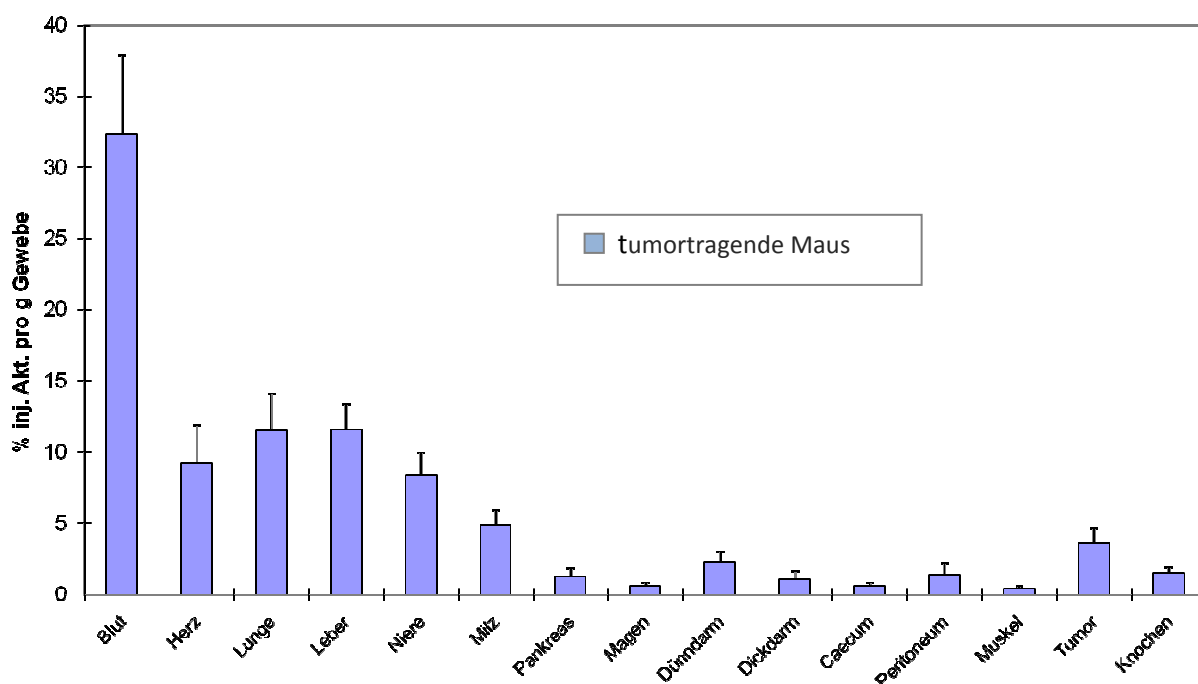


Abb. 20: Biodistribution nach i.v. Injektion und 45 min Inkubation von 2,96 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK

Die intravesikale Instillation des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK erfolgte mit einer Aktivität von 6,66 MBq zunächst an unbehandelten Tieren (ungekauterte Blasen). Abb. 21 zeigt die deutliche Retention des Radioimmunkonjugates 45 min (4,6% inj. Akt./g) und

90 min (3,7% inj. Akt./g) nach Instillation in der Blase, trotz fortgesetzter Ausscheidung von Urin während der Einwirkzeit. Nur ein minimaler prozentualer Anteil der applizierten Aktivität (nach 45 min: 0,29% inj. Akt./g; nach 90 min: 0,16% inj. Akt./g) gelangte bei dieser Applikationsform in die Nieren. Die Erklärung für die nachgewiesene Aktivität in den Nieren liegt sehr wahrscheinlich in dem retrograden Aufstieg des Radioimmunkonjugates über die Ureteren durch den erzeugten Druck in der Blase. Im Gegensatz zur systemischen Applikation (Abb. 20) konnte in Blut, Herz, Lunge, Leber, Milz und Darm keine Aktivität über 0,1% inj. Akt./g nachgewiesen werden.

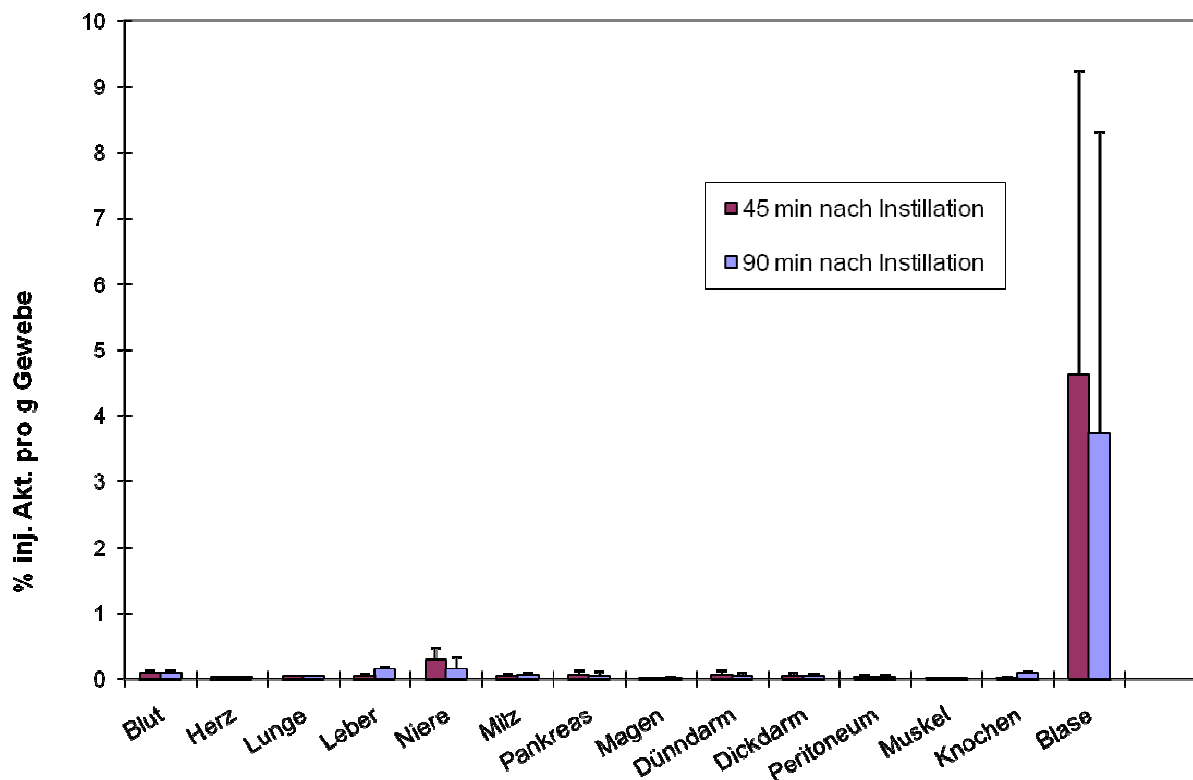


Abb. 21: Verteilung des RIK nach intravesikaler Instillation von 6,66 MBq in ungekauterte Mäuse, 45 und 90 min nach Instillation

In einer weiteren Biodistributionsstudie wurde die Anreicherung des RIK nach intravesikaler Instillation an gekauterten Tieren und an ungekauterten Kontrollmäusen untersucht. 90 min nach Applikation von 1,85 MBq zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Anreicherung der Aktivität in den Organen (Abb. 22). Die gekauterten Mäuse zeigten trotz intravesikaler Instillation wesentlich höhere Anteile der applizierten Aktivität in den Organen (in % inj. Akt./g: Blut 8,3; Herz 1,6; Lunge 2,6; Leber 3,3; Niere 2,7; Milz 1,7) aufgrund des Anschlusses an den Blutweg. Dieser Anschluss wurde durch die urothelialen Läsionen unmittelbar nach Kauterung geschaffen. Der retinierte Anteil der Aktivität in der gekauterten Blase betrug 6,8% inj. Akt./g. Bei den Tieren mit unverletztem Urothel lag der prozentuale Anteil der retinierten Aktivität im Vergleich zu den gekauterten Tieren mit 8,2% inj. Akt./g ähnlich hoch, während nur ein sehr geringer Anteil der Aktivität in den Organen (in % inj. Akt./g: Blut 0,9; Herz 0,4; Lunge 0,4; Leber 0,6; Niere 1,5; Milz 0,2) nachgewiesen werden konnte. Unmittelbar nach Kauterung und der damit verbundenen akuten Blutung des Urothels ist demnach die Gefahr einer erhöhten Anreicherung des RIK in den Organen am höchsten.

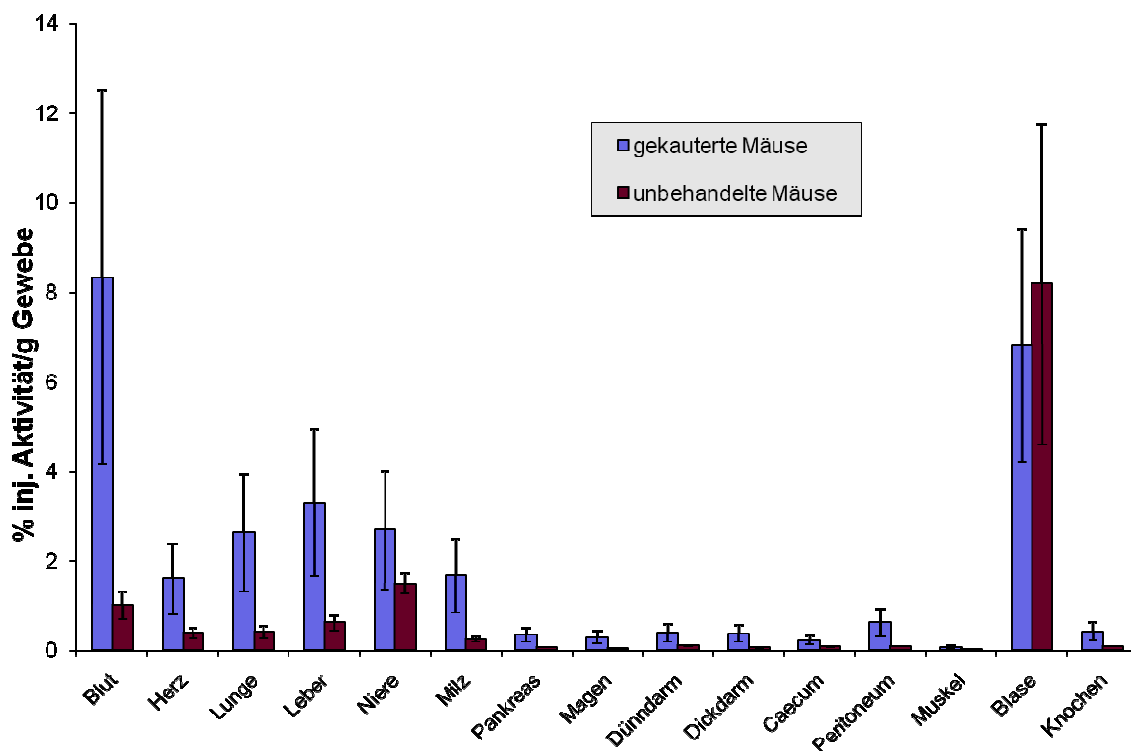


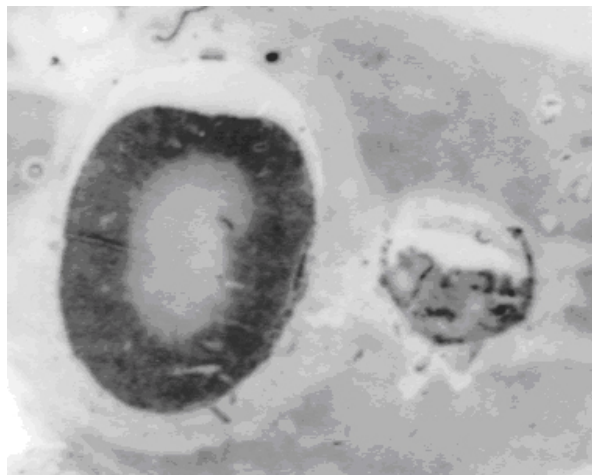
Abb. 22: Verteilung des RIK nach intravesikaler Instillation von 1,85 MBq in gekauterte und ungekauterte Mäuse, 90 min nach Instillation.

4.3.4 Verteilung von ^{213}Bi und ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk im Nierengewebe

Die renale Lokalisation von freiem und gebundenem ^{213}Bi wurde mittels Mikroautoradiographie mit dem digitalen Micro-Imager bestimmt. 45 min nach i.p. Injektion von 4,44 MBq freiem oder MAk-gebundenem ^{213}Bi wurden Kryoschnitte einer Niere in Kombination mit Muskelgewebe (M. quadriceps femoris) als Negativkontrolle angefertigt und diese im Micro-Imager untersucht.

Das renale Verteilungsmuster zeigt eine identische Lokalisation der Aktivität des freien und MAk-gebundenen ^{213}Bi (Abb. 24 a und b). Das stärkste Signal wurde in der Nierenrinde und der äusseren Zone des Nierenmarks detektiert, während nur eine geringe Aktivität in der inneren Zone des Nierenmarks und des Nierenbeckens gefunden wurde. Im Muskelgewebe konnte keine Anreicherung des ^{213}Bi festgestellt werden. Es ergab sich demnach eine identische renale Verteilung unabhängig von der Applikationsform des ^{213}Bi .

a



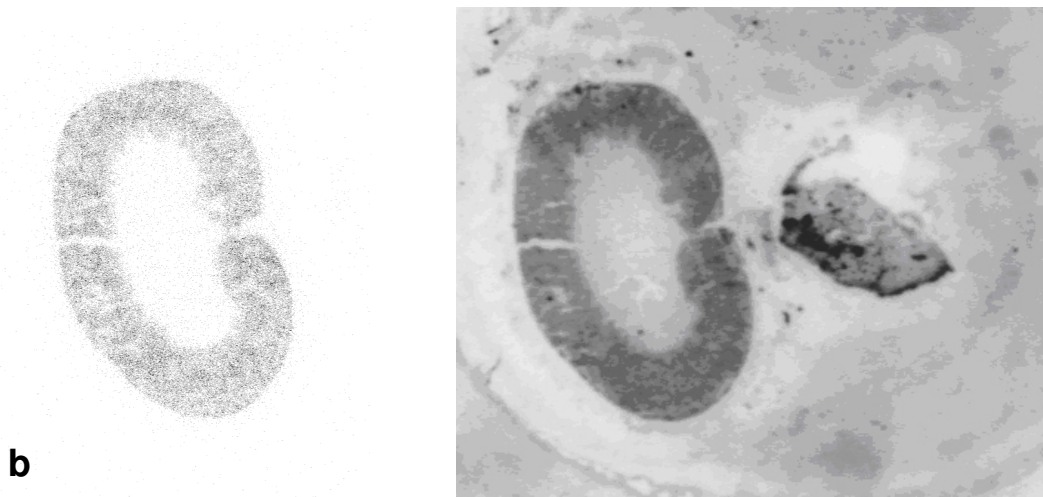


Abb. 23: Nierenschnitte einer Nacktmaus a) nach i.p. Injektion von 4,44 MBq freiem ^{213}Bi und b) nach i.p. Injektion von 4,44 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk (jeweils rechts nativer Kryoschnitt mit Muskel, links Mikroautoradiographie).

4.3.5 Therapeutische Effizienz

Zur Ermittlung des optimalen Tumorstadiums für die Therapie und der optimalen einzusetzenden Aktivität wurden vergleichende Therapieversuche 1 Stunde, 7 Tage und 14 Tage nach Instillation der EJ 28-luc-Zellen mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk und mit dem standardmässig in der Humanmedizin angewandten Chemotherapeutikum Mitomycin C an Tiergruppen von jeweils 10 Mäusen durchgeführt, die eine statistisch verlässliche Aussage erlauben.

4.3.5.1 Überlebenszeit nach EJ 28-Zellinokulation

Zur Ermittlung der Überlebenszeiten der Kontrolltiere und der therapierten Tiere nach Zellinokulation wurden weiblichen 10 Wochen alten Nacktmäusen 2×10^6 EJ 28-luc intravesikal instilliert. Jeweils 1 h, 7 d oder 14 d danach wurde den Tieren 0,37 MBq oder 0,925 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk in die Harnblase verabreicht. Zwei weiteren

Tiergruppen wurde nach 1 h oder 7 d jeweils 40 µg Mitomycin C intravesikal instilliert, die Kontrollgruppe erhielt 1 h nach Zellinstillation PBS. Der Beobachtungszeitraum der Tiere betrug 300 Tage. Abbruchkriterien waren adspektorisch erkennbarer Aszites, Tumorkachexie oder eine das Allgemeinbefinden beeinträchtigende Tumorgrosse. Die Tiere wurden dann euthanasiert und obduziert. Die Überlebensdaten der Tiere wurden in Kaplan-Meier-Diagrammen dokumentiert und die statistischen Signifikanzen mit dem log-rank-test ermittelt.

Abb. 24 zeigt die Überlebenszeit der Kontrollgruppe. Die untherapierten Tiere mussten aufgrund der Tumorgrosse zwischen Tag 28 und Tag 69 nach Tumorzellinokulation euthanasiert werden. Es ergab sich ein Median der Überlebenszeiten der Kontrolltiere von 41 Tagen (n = 10).

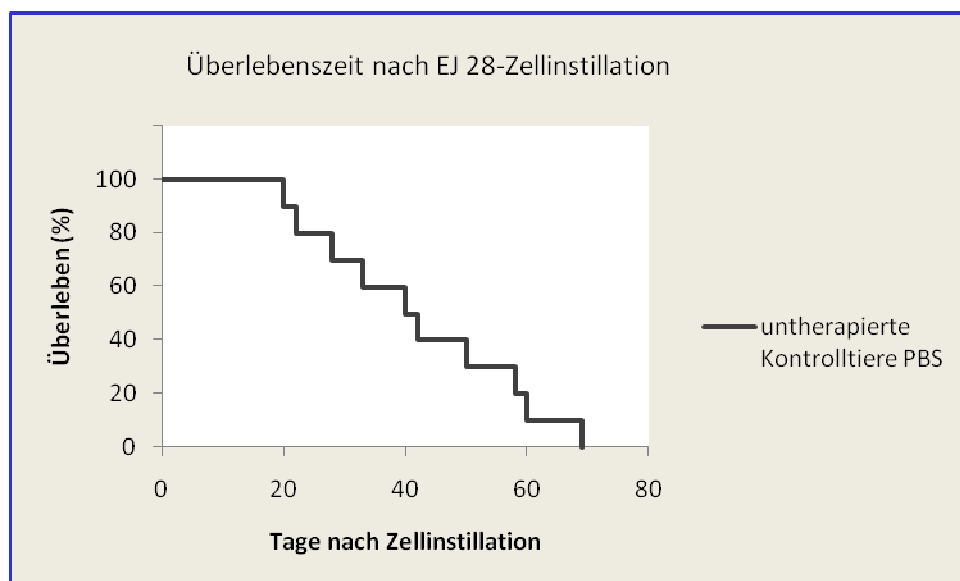


Abb. 24: Kaplan-Meier-Diagramm xenotransplanteder untherapierter Nacktmäuse: Überlebenszeit nach intravesikaler Instillation von 2×10^6 Zellen EJ 28-luc (n=10)

4.3.5.2 Überlebenszeit nach lokoregionaler Therapie

Alle Therapiegruppen sowohl nach Behandlung mit ^{213}Bi -MAk als auch mit Mitomycin C unterschieden sich im Überleben signifikant ($p < 0,05$) von der untherapierten Kontrollgruppe, selbst in der 14 Tage nach Zellinstillation mit 0,925 MBq ^{213}Bi -MAk therapierten Gruppe erreichten noch 40% der Tiere ein Überleben von >300 Tagen.

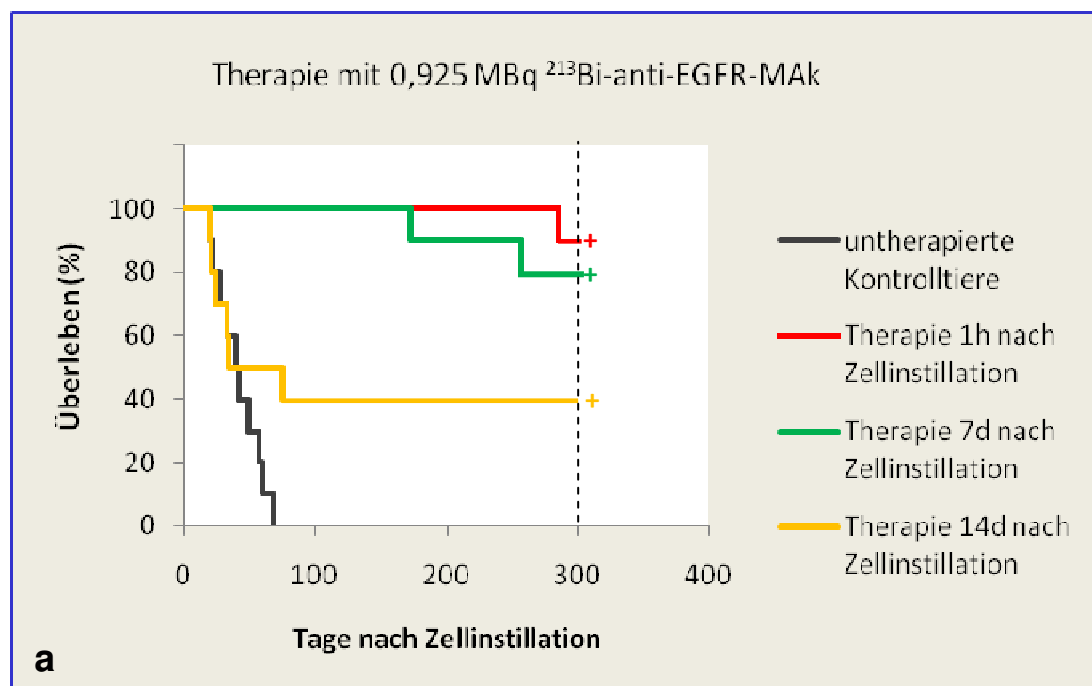
Therapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk

Die intravesikale Instillation von 0,925 MBq ^{213}Bi -MAk führte bei Applikation 1 h und 7 d nach Zellinokulation zu hochsignifikantem ($<0,01$) Unterschied im Überleben zur Kontrollgruppe, 90% bzw. 80% der Tiere erreichten über 300 Tage tumorfreies Überleben. Der Median der Überlebenszeit betrug in der 1 Stunde nach Zellinstillation therapierten Gruppe 300 Tage (IQA: 300-300) (Tab. 6) und lag somit hochsignifikant höher als das mediane Überleben von 41 Tagen (IQA: 25-59) der untherapierten Gruppe. Die 7 d nach Zellinstillation therapierte Gruppe wies ebenfalls einen Median der Überlebenszeiten von 300 Tagen (IQA: 257-300) auf. Deutlich schlechter fiel das Überleben der Tiere aus, wenn sie die Therapie 14 d nach Zellinokulation erhielten.

Eine spätere Applikation von ^{213}Bi -MAk 14 d nach Zellinstillation führte dazu, dass 40% der Tiere ein tumorfreies Überleben von <300 Tagen erreichten. Jedoch war dieser Überlebensunterschied, verglichen mit den Kontrolltieren, nicht mehr signifikant, obwohl die spät einsetzende Therapie eine geringfügige Verlängerung der Lebenserwartung im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkte. Der Median der Überlebenszeit dieser Gruppe lag bei 55 Tagen (IQA: 22,5-300).

Der therapeutische Einsatz von 0,37 MBq des RIK zeigte bei der 1 h nach Zellinokulation therapierten Gruppe mit einem medianen Überleben von 300 Tagen (IQA: 300-300) keinen Unterschied des Überlebens im Vergleich zu der nach 1h therapierten Gruppe, die 0,925 MBq ^{213}Bi -MAk erhielt. Auch hier erreichten 90% der Tiere über 300 Tage tumorfreies Überleben. Somit ist es deutlich, dass bei einer frühestmöglich einsetzenden Therapie der gleiche therapeutische Erfolg mit einer wesentlich geringeren Aktivität erzielt werden kann.

Eine 7 d nach Zellinstillation einsetzende Therapie mit 0,37 MBq zeigte ein deutlich schlechteres Überleben, verglichen mit der Gruppe, die 0,925 MBq 7 d nach Zellinstillation erhielt. In dieser Gruppe erreichten mit einem Median der Überlebenszeiten von 49 Tagen (IQA: 33,5-300) nur noch 50% der Tiere ein tumorfreies Überleben. Beachtet man die Interquartilsabstände, ergibt sich jedoch immer noch eine höhere Überlebenszeit bezogen auf die Kontrollgruppe. Offensichtlich ist die geringe Aktivität von 0,37 MBq bei sich nach 7 Tagen bereits formierenden oberflächlichen Tumoren nicht mehr in der Lage, alle Tumorzellen zu zerstören. In den Kaplan-Meier-Diagrammen (Abb. 25 a und b) werden die Überlebenskurven aller mit ^{213}Bi -MAk therapierten Gruppen im Vergleich zur untherapierten Kontrollgruppe dargestellt.



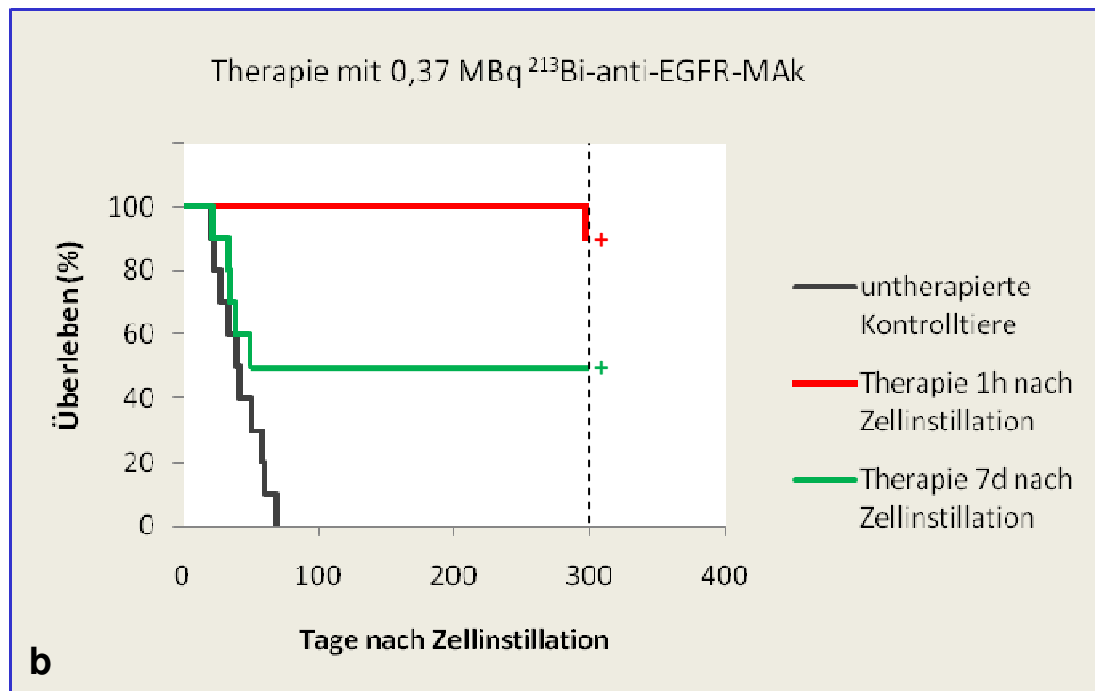


Abb. 25: Kaplan-Meier-Diagramme xenotransplantierten Nacktmäuse nach ^{213}Bi -Immuntherapie mit a) 0,925 MBq 1h, 7d und 14d nach Zellinstillation und b) 0,37 MBq 1h und 7d nach Zellinstillation im Vergleich zur untherapierten Kontrollgruppe.

Therapie mit Mitomycin C

Auch die mit 40 μg Mitomycin C, gelöst in 100 μl NaCl, therapierten Tiergruppen zeigten einen hochsignifikanten ($p < 0,01$) Unterschied im Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei scheint der Zeitpunkt der Instillation weniger von Bedeutung zu sein: Bei der Gruppe, die 1 h nach Zellinstillation therapiert wurden, erreichten 40% der Tiere ein tumorfreies Überleben über 300 Tage, bei der nach 7 d therapierten Gruppe erreichten es 50% der Tiere. Auffällig war jedoch ein deutlich verlängertes medianes Überleben von 289 Tagen (IQA: 110-300) der nach 1 h therapierten Gruppe und von 251 Tagen (IQA: 137,5-300) bei der nach 7 d mit Mitomycin C therapierten Gruppe im Vergleich zu der Gruppe, die 7 d nach Zellinstillation 0,37 MBq ^{213}Bi -MAk erhielt (Median der Überlebenszeit 49 Tage (IQA: 33,5-300)) und bei der ebenfalls 50% der Tiere 300 Tage überlebte (Abb. 25 b).

Die intravesikale Mitomycin C-Therapie führte somit ebenfalls zu einem deutlich erhöhten Überleben im Vergleich zur untherapierten Kontrolle.

Bei der anschliessenden Sektion der mit Mitomycin C therapierten Tiere fielen jedoch regelmässig pathologische Befunde der Nieren auf. Es zeigten sich bei fast allen sezierten Tieren Nephrozirrhosen mit deutlich verkleinerten Nieren und unregelmässigen Organoberflächen. Zudem traten gelegentlich generalisierte Lymphadenopathien auf. Der Grund könnte darin liegen, dass Mitomycin C enzymatisch in Leber und Niere inaktiviert, dort seine nekrotisierenden Eigenschaften entfaltet und über die Niere ausgeschieden wird. Studien zur intravesikalen Instillation von Mitomycin C belegen, dass bei einem Molekulargewicht von 334 Da zwischen 1 und 5% der Substanz transurothelial resorbiert werden können (van Helsdingen et al., 1988; De Bruijn et al., 1992). Auch eine durch die Mitomycin C-Instillation induzierte Zystitis lässt die Möglichkeit einer erhöhten systemischen Aufnahme des Wirkstoffes zu.

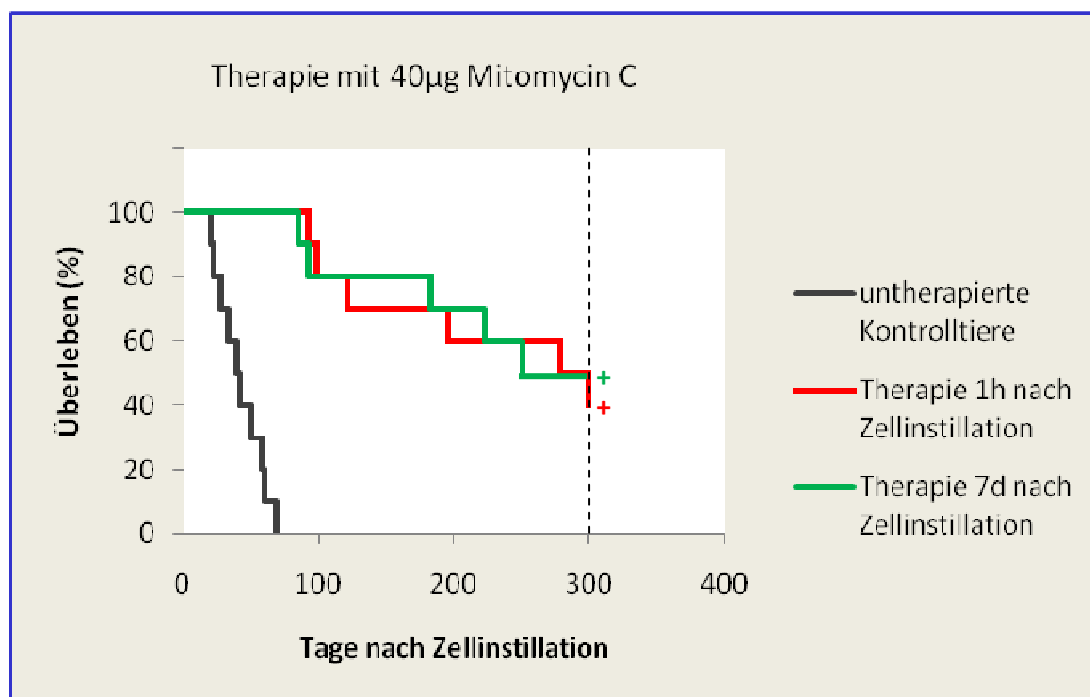


Abb. 26: Kaplan-Meier-Diagramm xenotransplantierte Nacktmäuse nach Mitomycin C-Therapie 1h und 7d nach Zellinstillation im Vergleich zur untherapierten Kontrollgruppe

Vergleich der Therapien mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk und Mitomycin C

In den folgenden Kaplan-Meier-Diagrammen werden die mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk und Mitomycin C jeweils 1 h und 7 d nach Zellinstillation therapierten Gruppen verglichen (Abb. 27 a und b).

Es zeigt sich bei den Gruppen, die nach 1 h oder nach 7 d mit 0,925 MBq therapiert wurden (im Folgenden als 1 h- und 7 d-Gruppen bezeichnet), eine deutliche Überlegenheit der ^{213}Bi -Immuntherapie gegenüber der Chemotherapie. Es erreichten 90% bzw. 80% der Tiere ein tumorfreies Überleben von über 300 Tagen im Vergleich zu den mit Mitomycin C therapierten 1 h- und 7 d-Gruppen, bei denen nur 40% bzw. 50% der behandelten Mäuse ein Überleben von über 300 d erreichten.

Bei den Gruppen, die nach 1 h oder 7 d 0,37 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk erhielten, wurde deutlich, dass der Erfolg der Radioimmuntherapie und auch die Überlegenheit gegenüber der Mitomycin C-Therapie abhängig vom Zeitpunkt der Instillation ist. So erreichte die nach 1 h mit 0,37 MBq therapierte Gruppe einen Median der Überlebenszeit von über 300 Tagen und lag damit signifikant ($p < 0,05$) höher als die nach 1 h oder 7 d mit Mitomycin C therapierten Gruppen (Median der Überlebenszeit 289 d (IQA: 110 bis >300 d) bzw. 251 d (IQA: 138 bis >300)).

Anders sah es jedoch bei der nach 7 d mit 0,37 MBq therapierten Gruppe aus: Bezüglich des medianen Überlebens dieser Gruppe mit 49 Tagen (IQA: 34 bis >300) erreichten beide mit Mitomycin C therapierten Gruppen ein höheres medianes Überleben. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die gewählte Aktivität zu gering war, bzw. der Tumor 7 d nach Zellinstillation bereits zu gross war, als dass mit 0,37 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk alle Tumorzellen abgetötet werden konnten.

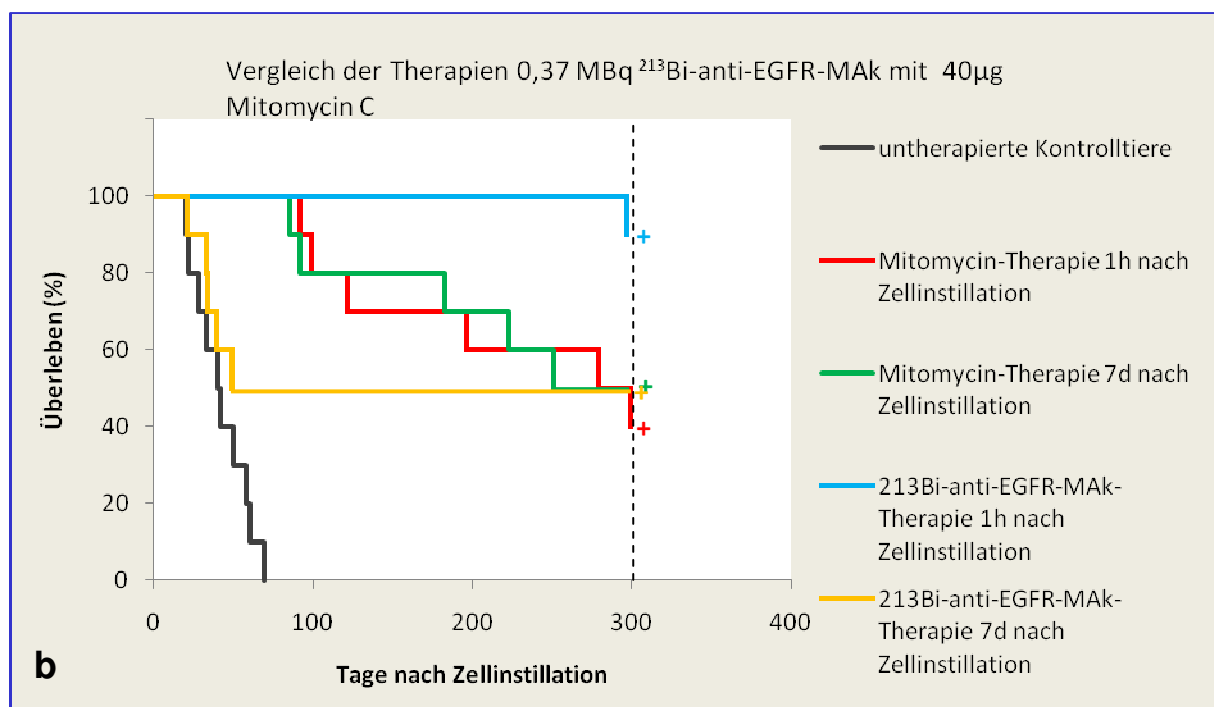
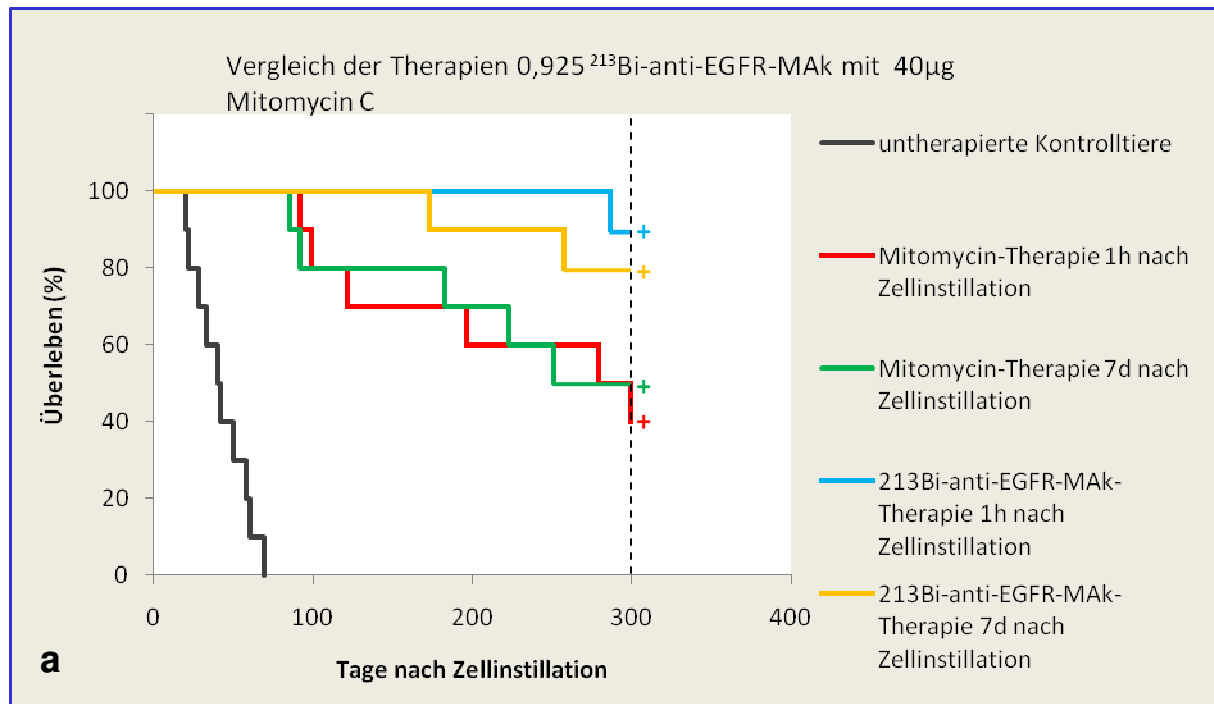


Abb. 27: Kaplan-Meier-Diagramme xenotransplanteder Nacktmäuse: Vergleich des Überlebens nach Therapie mit 40 μg Mitomycin C mit a) 0,925 MBq und b) 0,37 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk 1h und 7d nach Zellinstillation in Bezug zur untherapierten Kontrollgruppe.

Tabelle 6 fasst die Überlebenszeiten der Therapiegruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe übersichtlich zusammen. Angegeben sind Median und Interquartilsabstände (IQA). Die Gruppengrösse lag jeweils bei 10 Tieren.

Die Ergebnisse der Therapiestudien belegen, dass die Überlebenszeit der mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk therapierten Tieren im Vergleich zu den untherapierten Kontrolltieren und auch im Vergleich zu der in der Humanmedizin eingesetzten Standardtherapie mit Mitomycin C verlängert wurde. Die Applikation des Radioimmunkonjugates 1 h nach Zellinstillation verbesserte den Therapieerfolg deutlich und führte zum nahezu vollständigen Absterben der Tumorzellen. Bereits eine Woche nach Zellinstillation haben sich oberflächliche Urothelkarzinome gebildet, so dass ab einer bestimmten Tumorgrösse das Tumorstadium bei einer späteren Applikation der α -Radioimmuntherapie (7 d bzw. 14 d nach Zellinstillation) zwar verlangsamt werden konnte, jedoch nicht alle Tumorzellen zerstört wurden.

Tab. 6: Median der Überlebenszeiten in Tagen (d) nach Therapie mit ^{213}Bi -Immunkonjugat und Mitomycin C im Vergleich zur untherapierten Kontrolle; jede Gruppe umfasste 10 Tiere, IQA = Interquartilsabstand, n.b. = nicht bestimmt

Therapie (Zeit nach Zellinokulation)	Median der Überlebenszeiten nach intravesikaler Instillation von		
	^{213}Bi -anti-EGFR-MAk		Mitomycin C
	0.37 MBq	0.925 MBq	40 μg
1 h	>300 d (1 Maus starb an Tag 297 an Infektion)	>300 d (1 Maus starb an Tag 286 an Infektion)	289 d (IQA: 110 - >300)
7 d	49 d (IQR: 34 - >300)	>300 d (2 Mäuse starben an Tag 173 und 257 an Infektionen)	251 d (IQA: 138 - >300)
14 d	n.b.	55 d (IQA: 23 - >300)	n.b.
Kontrolle	41 d (IQA: 25 - 59)		

4.3.5.3 Kontrolle der therapeutischen Effizienz mittels Biolumineszenz Imaging

Die therapeutische Effizienz des Radioimmunkonjugates und der Chemotherapie wurde pro Gruppe noch zweimal nach der Therapie im Abstand von 4 Wochen mittels Optical Imaging kontrolliert, um die Regression des Tumors zu belegen. Die intravesikale Therapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk 7 d nach Zellinstillation konnte kleine Tumorzellcluster erfolgreich abtöten und es konnte keine Lichtemission mehr festgestellt werden (Abb. 28). Die Therapie 14 d nach Zellinstillation konnte die Tumorlast der Tiere verringern und das Tumorwachstum zunächst hemmen, jedoch konnte mittels Biolumineszenz Imaging 35 Tage nach Therapie wieder eine Tumorprogression nachgewiesen werden (Abb. 29).

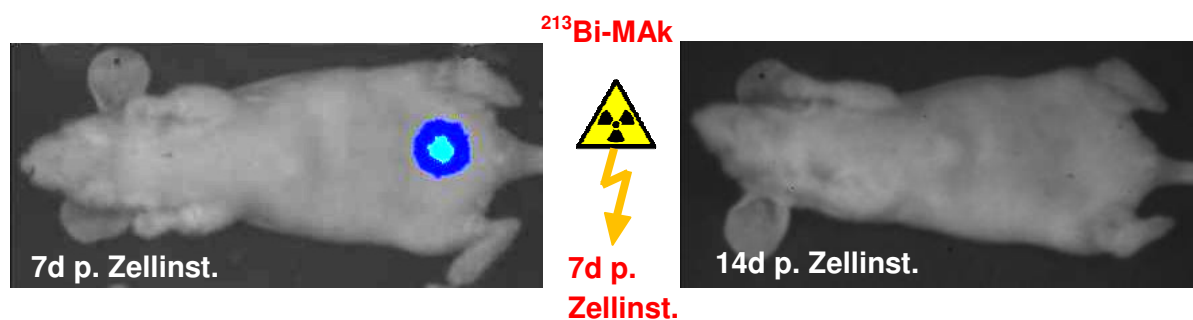


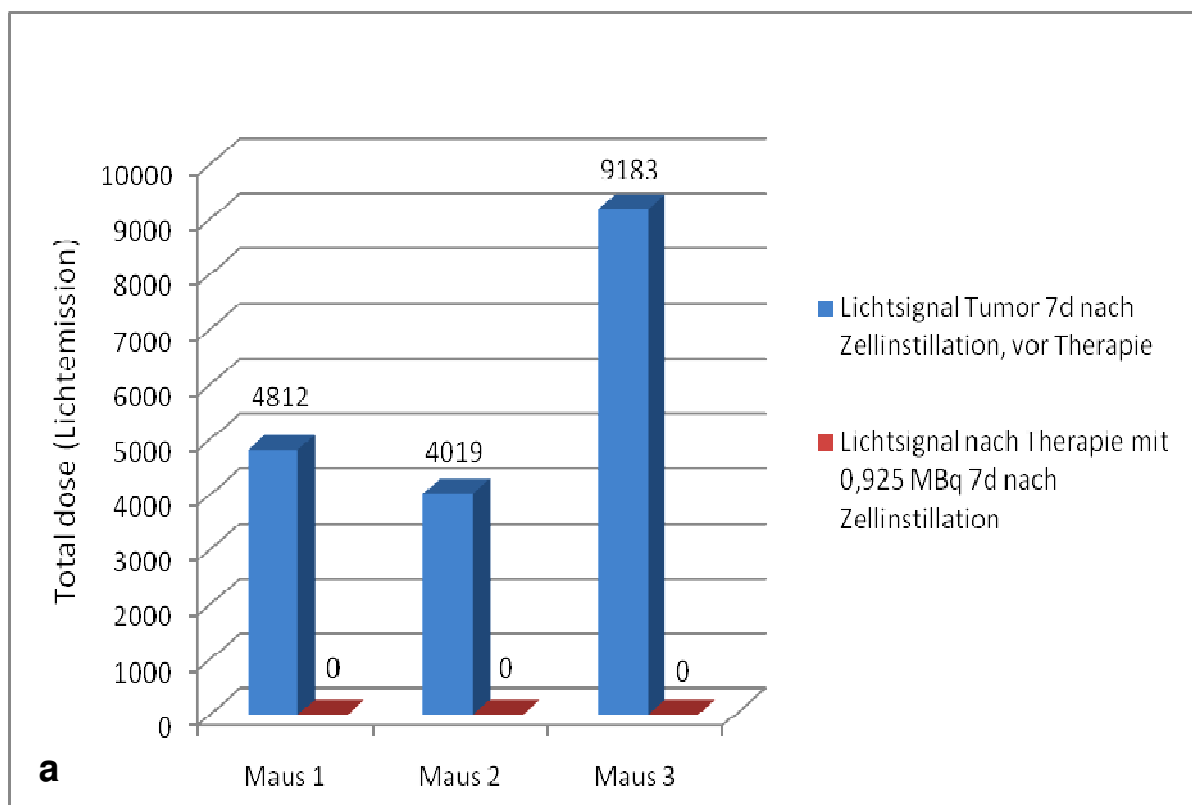
Abb. 28: Biolumineszenz Imaging eines Urothelkarzinoms 7 Tage nach Zellinstillation und 7 Tage nach intravesikaler Therapie mit 0,925 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk (14 Tage nach Zellinstillation).



Abb. 29: Urothelkarzinom 14 Tage nach Zellinstillation und dieselbe Maus, 7 Tage und 35 Tage nach intravesikaler Therapie mit 0,925 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk

Die Lichtemissionen der Tumorzellen konnten mit Hilfe des Simple-PCI Programms als „total dose“ quantifiziert werden.

Dazu wurden ausgewählte Tiere jeweils 1 Tag vor sowie 7 Tage nach der Therapie mittels Biolumineszenz Imaging aufgenommen und über der Blasenregion eine „Region of Interest“ (ROI) gelegt. Die Auswertung erfolgte nach Subtraktion des Hintergrundsignals vom Tumorsignal innerhalb der ROI. In der Abb. 30 a und b sind die emittierten Lichtsignale als „total dose“ 1 Tag vor Therapie und 7 Tage nach Therapie der 7 d- und 14 d - Gruppen anhand von drei ausgewählten Mäusen dargestellt. Abb. 30 b zeigt, dass nach der Therapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk 14 d nach Zellinstillation die Tumorlast zwar deutlich verringert werden konnte, jedoch die Tumorzellen nicht vollständig abgetötet wurden.



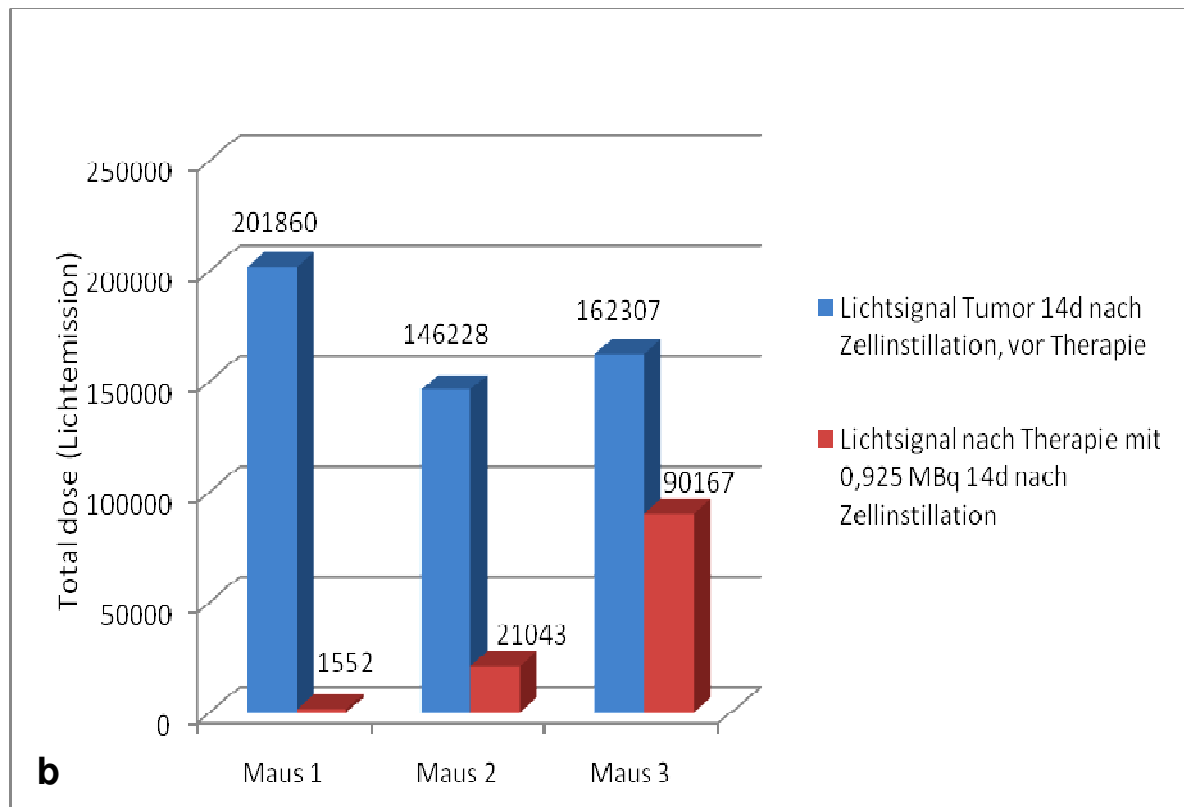


Abb. 30: Graphische Darstellung der quantifizierten Lichtsignale der Tumorzellen bei drei ausgewählten Tieren 1 Tag vor und 7 Tage nach Therapie mit jeweils 0,925 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk, a) 7d-Gruppe, b) 14d-Gruppe.

4.4 Histologie

4.4.1 Expression von EGFR des xenotransplantierten Blasentumors

Die EGFR-Expression der xenotransplantierten Blasentumore wurde mittels Immunhistochemie nachgewiesen. Hierzu wurde von den nach Sektion in Stickstoff konservierten tumortragenden murinen Blasen 4 μm dicke Kryoschnitte angefertigt und nach dem unter 3.11.3 beschriebenen IHC-Protokoll eingefärbt. Eine farbliche

Reaktion der Horse Radish Peroxidase (HRP) mit Diaminobenzidin (DAB) stellte den EGF-Rezeptor als braun gefärbtes Präzipitat dar.

Eine Gegenfärbung mit Hämatoxilin und sofortigem Bläuen in Leitungswasser stellte die unveränderten Anteile des Urothels und die Schichten der Blasenwand bläulich dar. Auf diese Weise liess sich das humane Urothelkarzinom histologisch in der murinen Blase nachweisen. Als Positivkontrolle diente ein humanes EGFR-überexprimierendes Mammakarzinom, als Negativkontrolle eine gesunde Blase einer Maus.

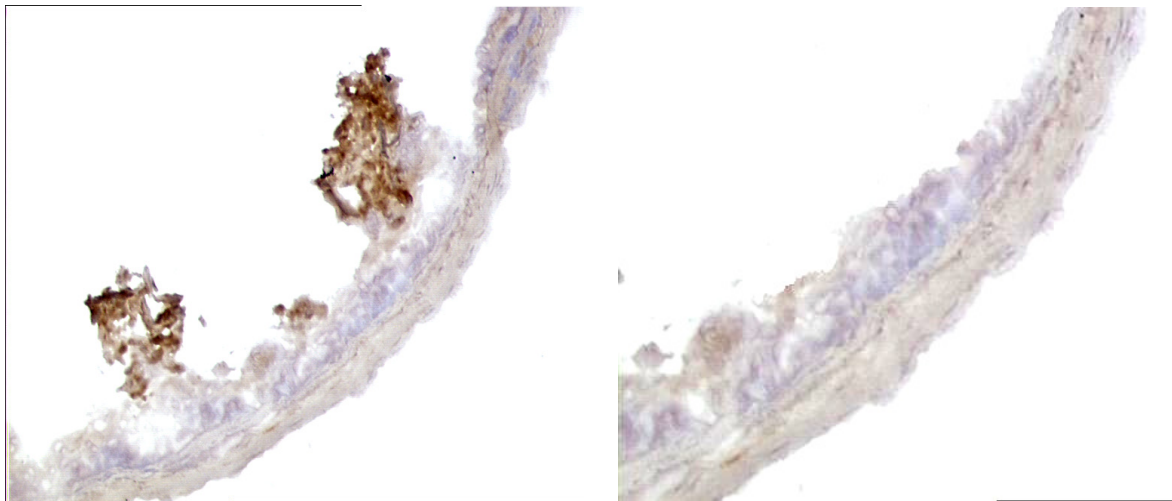


Abb. 31: Immunhistochemische Anfärbung des EGF-Rezeptors. Links: Urothelkarzinom (braun angefarbter EGF-Rezeptor), rechts: unverändertes Urothel einer Kontrollmaus

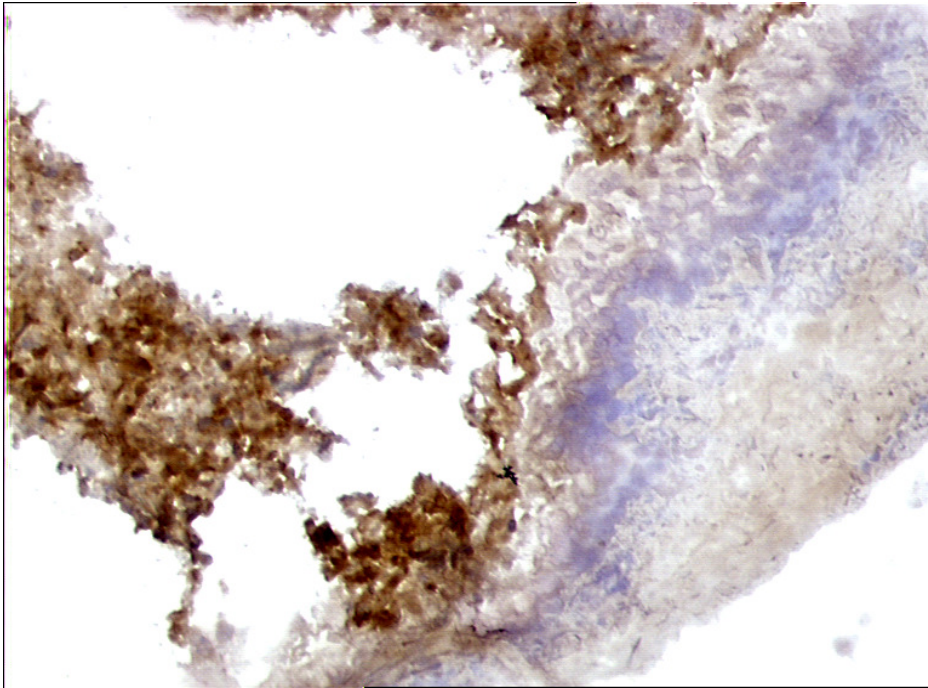


Abb. 32: Immunhistochemische Anfärbung des EGF-Rezeptors des humanen Harnblasenkarzinoms (braun). Gut sichtbar die drei Schichten (Urothel, Lamina propria, Tunica muscularis) der murinen Blasenwand (blau).

Die murine Blasenwand wird aus Übergangsepithel mit einer gut vaskularisierten Lamina propria, einer feinen Muscularis und der Adventitia gebildet. Sie stellte sich in der IHC-Färbung blau dar. Die Dicke der Blasenwand ist abhängig vom Grad der Dehnung durch den Blaseninhalt; so ist das gedehnte Übergangsepithel zwei bis drei Zellschichten dick, während die leere Blase histologisch eine starke Fältelung des Urothels und der Lamina propria zeigt. Bei dieser immunhistochemischen Anfärbung des EGF-Rezeptors stellte sich der EGFR auf den Tumorzellen braun dar, somit lassen sich histologisch die Tumorzellen vom unveränderten Urothel gut abgrenzen.

„Die Praxis sollte das Ergebnis des Nachdenkens sein, nicht umgekehrt.“

Hermann Hesse

5 DISKUSSION

Für die Entstehung eines Urothelkarzinom-Rezidivs nach TUR ist eine frühe Implantation disseminierter Tumorzellen an die Urothelläsionen der kritische Moment. Abgesehen von adjuvanten intravesikalen Chemotherapien und BCG-Instillationen, die wegen ihrer unspezifischen Wirkungsweise mit schweren Nebenwirkungen verbunden sind, steht bislang keine adäquate Therapie der Einzelzell-Tumoraussaat zur Verfügung. Die vorliegende Studie untersucht eine neue intravesikale Therapiestrategie, die auf der lokoregionalen Applikation eines Antikörpers, gekoppelt an den zytotoxischen α -Emitter ^{213}Bi , gegen ein tumorassoziertes Antigen basiert. Dazu wurde ein orthotopes Urothelkarzinom-Tiermodell entwickelt, welches nach vorsichtigem Kautern des murinen Urothels vor Instillation von humanen Blasenkarzinomzellen mit hoher EGFR-Expression die klinische Situation nach TUR am besten widerspiegelt. Durch das Einbringen der Radioimmunkonjugate mittels eines Katheters in die Harnblase, und der damit verbundenen Umgehung einer systemischen Applikation, ist eine erfolgreiche, nebenwirkungsarme Bekämpfung einzelner Tumorzellen und kleinerer Tumorzellaggregate in der Harnblase in greifbare Nähe gerückt.

5.1 In vitro Studien

Der EGF-Rezeptor ist ein vielversprechendes Molekül für die zielgerichtete Radioimmuntherapie von EGFR-überexprimierenden Tumorzellen mit Antikörpern als Träger zytotoxischer Substanzen wie ^{213}Bi . Die Analyse nach Scatchard zur Ermittlung der EGFR-Expression der humanen Blasenkarzinomzelllinie EJ 28-luc ergab eine Anzahl von ca. 5×10^5 EGF-Rezeptoren pro Zelle. Die EGFR-Expression dieser Zelllinie ist demnach bis zu 16-fach höher, verglichen mit den humanen Urothelkarzinom-Zelllinien RT 4 und J 28. Von beiden Zelllinien ist die EGFR-Expression beschrieben und liegt bei $3\text{--}4 \times 10^4$ EGFR-Molekülen pro Zelle (Brockhoff et al., 1994). Da der Grad der EGFR-Überexpression eng mit der Tumorprogression und auch der Prognose korreliert (Neal et al., 1990; Mellon et al., 1995; Bellmunt et

al, 2003), kann im Falle eines erfolgreichen Xenotransplantats der Zelllinie EJ 28 mit 5×10^5 EGF-Rezeptoren pro Zelle ein progressives, malignes Wachstum in der murinen Blase erwartet werden.

Der α -Emitter ^{213}Bi wurde als zytotoxisches Agens an den anti-EGFR-Antikörper Matuzumab gekoppelt. In verschiedenen experimentellen und klinischen Studien wurde gezeigt, dass α -Emitter mit hoher Energie, geringer Reichweite und somit einem hohen LET eine sehr wirkungsvolle Waffe sind, wenn sie mittels monoklonaler Antikörper oder Peptide an ihre Zielstruktur gebunden werden (Brechtel, 2007).

Eine effiziente Kopplung des Radionuklids an seinen Carrier ist die Voraussetzung für das Erzielen einer möglichst hohen Markierungsausbeute des Radioimmunkonjugates. Nach Inkubation des ^{213}Bi -Eluats mit den anti-EGFR-MAk waren nach Aufreinigung mittels Gelfiltration zwischen 95% und 97% des ^{213}Bi an die Antikörper gebunden. Zugleich war jedoch im Mittel nur jeder 1785ste der eingesetzten chelatierten Antikörpermoleküle Carrier des Nuklids (4.1). Daraus resultierte eine spezifische Aktivität von 0,35 bis 1,4 MBq / μg Ak. Bei Therapiestudien im Tiermodell sollen einmal Aktivitäten von 0,925 MBq und 0,37 MBq des Radioimmunkonjugates zum Einsatz kommen, das bedeutet umgerechnet auf die AK-Menge, dass die Tiere zwischen 0,3 und 2,6 μg AK erhalten, diese Menge wiederum entspricht $1,2 \times 10^{12}$ bis $10,4 \times 10^{12}$ Antikörper-Molekülen. Vor der Therapie wurden 2×10^6 EJ 28-luc-Zellen mit insgesamt 1×10^{12} Antigenen intravesikal instilliert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die größtmögliche Zahl von Antigenen bei einer Instillation von ^{213}Bi -MAk 1 h nach Zellinstillation abgesättigt werden. Bei einer Verdopplungszeit der Zelllinie EJ 28 von 24h (Krämer, 2005) würde dieses jedoch auch bedeuten, dass im unwahrscheinlichen Fall eines kompletten Verbleibens und Anwachsens aller instillierter 2×10^6 Zellen nach 7 Tagen $6,4 \times 10^{13}$ Antigene, bzw. nach 14 Tagen $8,2 \times 10^{15}$ Antigene der o. g. Antikörper-Menge gegenüber stehen und nicht mehr abgesättigt werden. In einer Studie von Zhu u. Mitarb. (1997) wird die Bedeutung der AK-Dosierung in der Radioimmuntherapie bestätigt: Es wurde gezeigt, dass eine Übersättigung der Tumorzell-Antigene aufgrund eines AK-Überschusses zu einer Abnahme der im Tumor akkumulierten Aktivität führen, dagegen ergab sich eine höhere akkumulierte Aktivität im Tumor, wenn nicht alle Antigene abgesättigt wurden.

Aufgrund der hohen Bindungsspezifität (39%) und Internalisierungskapazität (43 ng / 3×10^6 Zellen) des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk mit den EJ 28-luc-Zellen konnte in vitro im klonogenen Überlebenstest eine minimale Aktivitätskonzentration von 1,35 MBq / ml mit letaler Wirkung auf die Zellen ermittelt werden.

5.2 Etablierung und Darstellung des orthotopen Xenotransplantats

Da intravesikale chemotherapeutische Behandlungsstrategien nach transurethraler Resektion des Urothelkarzinoms bislang nur begrenzten Erfolg zeigen (Dalbagni and Herr, 2000; Bolenz et al., 2006; Shen et al., 2008), besteht das Ziel dieser Arbeit darin, ein neues therapeutisches Konzept zu entwickeln und dieses an einem zu etablierenden orthotop xenotransplantierten Mausmodell zu bewerten. Die Entwicklung eines orthotopen Mausmodells ist, obwohl wesentlich schwieriger zu etablieren als z.B. subkutan implantierte Tumoren, die beste Voraussetzung zur Bewertung neuer therapeutischer Strategien gegen das rezidivierende Urothelkarzinom nach TUR. Die Zelllinie EJ 28 ist bislang nur in einem subkutan xenotransplantierten Mausmodell untersucht worden (Kunze et al., 2008). Um ein orthotopes Mausmodell zu etablieren, müssen humane Blasenkarzinomzellen in die Harnblase immundefizienter Mäuse eingebracht werden. Ähnliche Modelle, deren Erfolg jedoch stark abhängig sowohl von der jeweilig verwendeten Zelllinie als auch vom gewählten Instillationsverfahren war, sind beschrieben (Watanabe et al, 2000; Black and Dinney 2007; Hadaschik et al., 2007), jedoch gibt es bislang kein nicht-invasives orthotopes Mausmodell mit der EGFR-überexprimierenden humanen Blasenkarzinom-Zelllinie EJ 28.

Zur Kontrolle des Tumorwachstums und der therapeutischen Effizienz sind tierschonende, nicht-invasive Verfahren zu bevorzugen. Für diese Zwecke sind bisher Tumorzellen stabil mit grün fluoreszierenden Proteinen (GFP) transfiziert worden, oder mit Lentiviren infiziert worden, die das Firefly-Luciferase Gen enthalten (Tanaka et al., 2003; Hadaschik et al., 2007) Um in dem in dieser Arbeit verwendeten

Modell ein erfolgreiches Angehen des Xenotransplantats und auch den Erfolg der Therapie des Tumors mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk mittels Optical Imaging überwachen zu können, ist die Zelllinie EJ 28 stabil mit dem Plasmid pcDNA3.1, welches die codierende Sequenz für Firefly Luciferase enthält, transfiziert worden.

Durch vorsichtiges Kautern der murinen Urothels vor der Tumorzell-Instillation wird die klinische Situation nach der TUR, in der sich disseminierte Tumorzellen schnell wieder an die entstandenen Läsionen im Urothel anheften, widergespiegelt. Auf diese Weise bietet sich in diesem Modell die Chance, die therapeutische Effizienz unmittelbar am menschlichen Tumor an seinem Ursprungsort, der Blase, zu untersuchen.

Eine erfolgreiche Tumoretablierung nach intravesikaler Zellinstillation mittels Katheter ist zum einen abhängig von der verwendeten Zelllinie und zum anderen abhängig von der Lage der durch das Kautern verursachten Läsionen. Diese Art der orthotopen Tumoretablierung führte zwar zu einer etwas verminderten Tumorangehrate als nach einer direkten Injektion der Zellsuspension in die freipräparierte Blasenwand (Soloway and Masters, 1980), jedoch ist die transurethrale Vorgehensweise weitaus weniger belastend für die Tiere als eine abdominale Chirurgie zur Freipräparation der Blase. Ein weiterer kritischer Moment bei der transurethralen Zellinstillation ist die Möglichkeit der Ausscheidung der Tumorzellen durch sich ansammelnden Urin während und nach der Narkose. In einem orthotopen Tiermodell von Hadaschik (2007) ist versucht worden, diesem Problem durch Ligieren der äusseren Harnröhre zu begegnen, dieses führte jedoch zu Nekrosen der äusseren Hautareale und ist aus Tierschutzgründen abzulehnen.

In dem Modell der vorliegenden Studie wurde während der Narkose der Katheter mit aufgesetzter Spritze in der Harnröhre belassen, so dass erst gegen Ende der Einwirkzeit ab einem gewissen Blasendruck der Urin an dem Katheter vorbei gedrückt wurde. Die unterschiedliche Ausprägung der Tumor-Manifestation nach Ablauf der jeweils gleichen Zeit nach Zellinstillation, wie sie sich in Optical Imaging Aufnahmen darstellten, lässt sich mit der nicht vorhersehbaren Ausscheidung einer unbestimmten Tumorzellzahl nach Inokulation begründen. Mit der unterschiedlichen

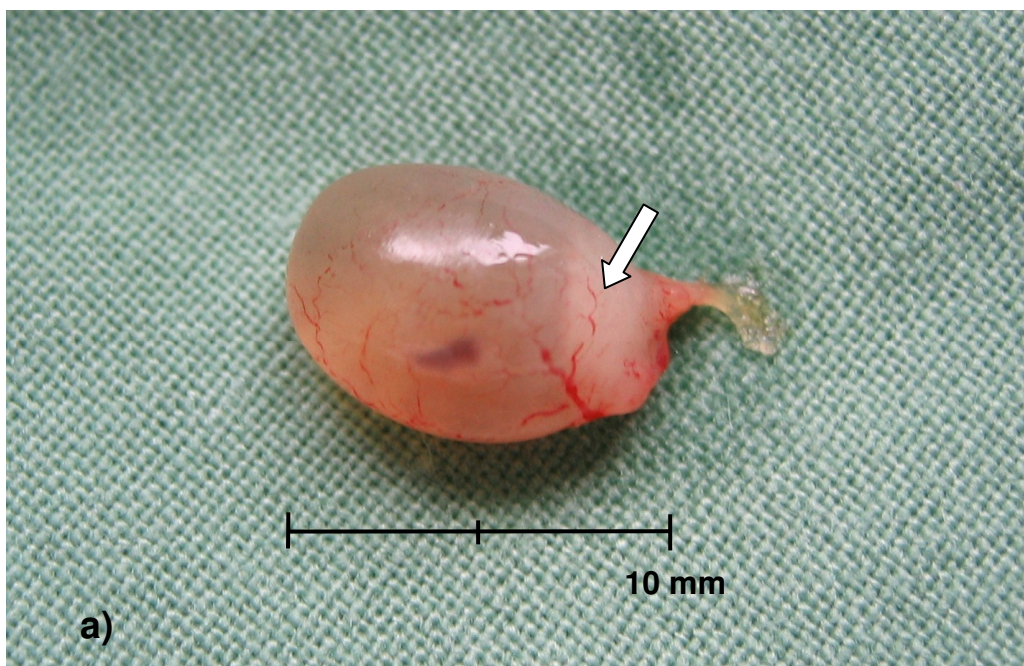
Tumorgröße erklärt sich auch das unterschiedliche Ansprechen der Tumoren auf die Therapie nach 7 bzw. 14 Tagen.

Die mit Firefly Luciferase transfizierte Zelllinie EJ 28-luc hat sich als hoch tumorigen erwiesen. Die Angehrate der humanen Blasentumorzellen konnte noch einmal gesteigert werden, indem die Zellsuspension bis unmittelbar vor Instillation in die Blase bei 4°C gelagert wurde, um den Zellstoffwechsel zu vermindern. Die intravesikale Instillation dieser Zelllinie nach Kautern des murinen Urothels führte zu einem Tumorangehrate in 80% der immundefizienten Mäuse. Es sind höhere Angehraten anderer Zelllinien nach intramuraler Implantation beschrieben (Kleinerman et al., 1996; Jiang and Zhou, 1997; Smakman et al., 2005), jedoch erfordert diese Art der Implantation, wie schon weiter oben erwähnt, zum einen ein tierbelastendes extensives chirurgisches Vorgehen mit Exposition der Blase, und zum anderen führt die intramurale Implantation zu einem muskelinvasiven Wachstum des Tumors, welches eine Bewertung der intravesikalen Radioimmuntherapie gegen das Urothelkarzinom nicht möglich macht. Die transurethrale Instillation von Tumorzellen mit nachfolgender Einwirkzeit auf das murine Urothel hingegen stellt ein Modell für das oberflächliche Urothelkarzinom (Soloway u. Masters, 1980; Werthman et al., 1996; Bonfil et al., 1997; Nogawa et al., 2005) und die klinische Situation nach TUR zur Erprobung neuer intravesikaler Therapien dar.

Einer selten auftretenden intrarenalen Tumorimplantation durch retrograd aufgestiegene Tumorzellen konnte durch Verminderung des Zellinstillationsvolumens auf 50 µl entgegen gewirkt werden. Eine Studie zu einem ähnlichen Mausmodell, in welchem jedoch keine Kauterisierung durchgeführt wurde, beschreibt das Problem der Blasen- und Urethraperforation während der Katheterisierung mit nachfolgender Tumorzellausbreitung im Abdomen 7 Tage nach Zellinstillation (Hadaschik et al., 2007). Dieses Problem ist sehr schwer nachzuvollziehen, da zum einen ein weicher Teflonkatheter ohne Mandrin das hochdehnbare Urothel der Mäuseblase nicht ohne weiteres perforieren kann, und zum anderen keine Maus mit perforierter Blase länger als 48 Stunden aufgrund einer rasch eintretenden Urämie mit nachfolgender urämischer Enzephalopathie überlebt.

Mittels Biolumineszenz-Imaging konnte in dem Mausmodell dieser Studie zu keinem Zeitpunkt nach Zellinstillation eine abdominale Ausbreitung der Tumorzellen festgestellt werden, daher konnte eine Perforation der Blasenwand durch das Kautern ausgeschlossen werden.

Es ist gelungen, die humane Urothelkarzinom-Zelllinie EJ 28-luc erfolgreich in einem orthotopen xenotransplantierten Mausmodell zu etablieren. Post mortem Sektionen der murinen Blasen zeigten, dass die Ausprägung der Krankheitssymptome weniger von der Tumorgröße, sondern von der Lokalisation des Tumors in der Blase abhängig war. So lebten Mäuse der nicht therapierten Kontrollgruppe mit einem deutlich palpierbaren Tumor im Blasenlumen unter Umständen länger symptomfrei, als Tiere, die einen wesentlich kleineren Tumor unmittelbar am Harnröhrenaussgang entwickelten (Abb. 33 a und b). Derartige Tumoren führten zu einer Urethraobstruktion mit nachfolgendem Rückstau des Urins in die Nieren und rasch einsetzender urämischer Symptomatik.



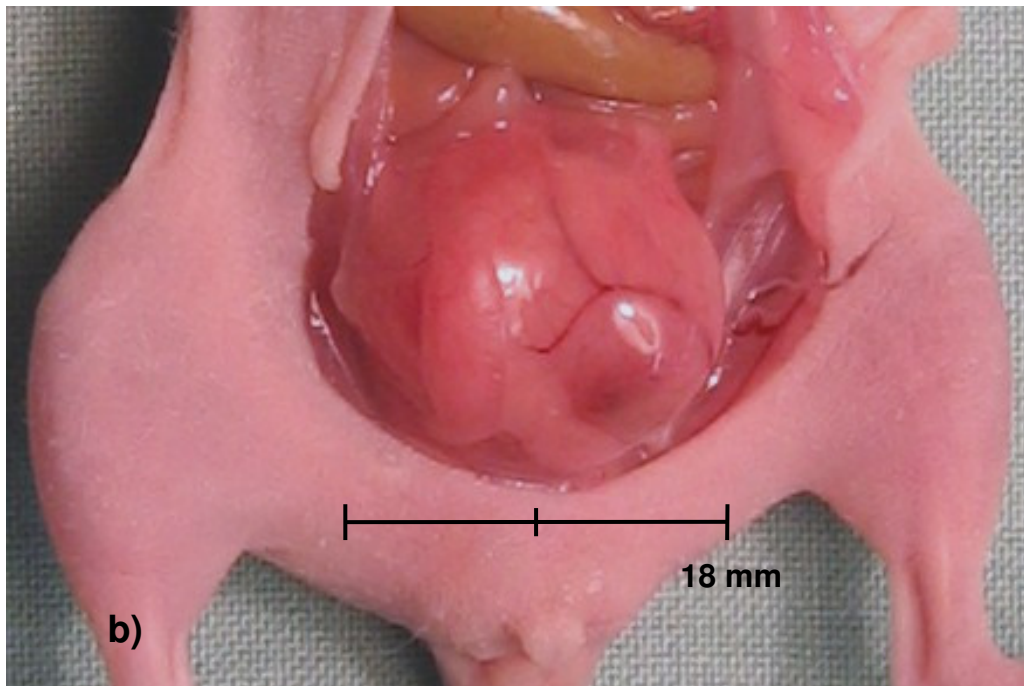


Abb. 33: a) Murine Blase, uringefüllt, mit Tumor (weisser Pfeil) an Urethramündung und nachfolgender Urethraobstruktion
b) Blasentumor, weit in das Lumen vorwachsend, ohne Obstruktion der Urethra, mit deutlicher Vaskularisation

Biolumineszenz Imaging

Das nicht-invasive Biolumineszenz-Imaging hat sich als exzellente Technik zur longitudinalen Darstellung und Überwachung der Tumorentwicklung sowie zur frühzeitigen Erkennung extravasikaler Tumorausbreitung und Metastasierung erwiesen (Sato et al., 2004). Mit Hilfe des Biolumineszenz-Imaging konnte in dieser Studie sowohl die Tumorentwicklung als auch die therapeutische Effizienz des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk im Vergleich zur Mitomycin C-Therapie zuverlässig bewertet werden. In vitro-Untersuchungen zur Bildgebung mittels Optical Imaging in Abhängigkeit von der Zellzahl führten bereits bei 1×10^4 EJ 28-luc Zellen zu einem deutlichen Biolumineszenzsignal.

Zu diesem Ergebnis kommt auch Buchhorn (2007) in seinen in vitro Biolumineszenz-Messungen mit der Luziferase-transfizierten Magenkarzinom-Zelllinie HSC45-M2. In vivo Studien zur Detektierbarkeit einer stabil mit Luziferase transfizierten Zelllinie

nach i.p; bzw. s.c. und i.v. Injektion ergaben bereits bei 1×10^3 HeLa-Zellen im Peritonealraum von Mäusen ein ausreichendes Biolumineszenzsignal (Edinger et al., 1999).

In dieser Arbeit ergab aufgrund der bauchwandnahen Lage der murinen Blase die Aufnahme von ventral das stärkste Signal, erfolgreiche Xenotransplantate konnten auf diese Weise ab dem 7. Tag nach Instillation nachgewiesen werden. Studien der eigenen Arbeitsgruppe von Landvogt und Abenstein (2006) bestätigten die hohe Sensitivität bei der Erfassung abdominalen, bauchwandnah gelegener Tumoren im Mausmodell, zeigten aber auch, dass das Biolumineszenzsignal tiefergelegener oder von anderen Organen verdeckter Tumoren nicht mehr von der CCD-Kamera dargestellt werden konnte.

Jurczok u. Mitarb. (2008) bestätigten in ihrer Studie ebenfalls die hohe Sensitivität des Biolumineszenz Imaging in der frühen Detektion von Tumorzell-Implantaten, weisen aber darauf hin, dass diese Technik bei einem fortgeschrittenen Tumorstadium aufgrund von Lichtsignal-Abschwächungen durch die Tumormasse weniger verlässlich ist. Wegen der ATP-Abhängigkeit bei der enzymatischen Umsetzung des Substrates Luciferin geben nekrotische Tumoreareale oder apoptotische Zellen kein Biolumineszenzsignal und können nicht dargestellt werden (Huber, 2003; Jurczok et al., 2008). Iyer u. Mitarb. (2002) erfassten eine gute Korrelation der Luciferase-Enzymaktivität mit dem resultierenden Biolumineszenz-Signal, welches eine Grundlage für quantitative Messungen des Tumorwachstums und der Tumorregression nach Therapie in der Mäuseblase bieten könnte.

Sonographie

Die Sonographie mit einer 13,5 MHz-Sektorsonde zur Detektion von Blasentumoren in der Maus zeigte ein Tumorwachstum frühestens ab dem 18. Tag nach Zellinstillation an. Aufgrund der hochauflösenden Sonde waren auch gering gefüllte Blasen schnell detektierbar, jedoch war diese Art der Bildgebung aufgrund regelmäßiger falsch positiver Resultate durch Artefakte, ausgelöst durch echogene gasgefüllte Darmschlingen, dem sensitiveren Biolumineszenz Imaging unterlegen.

Obwohl neue 40 MHz-Hochfrequenzsonden sogar in der Lage sind, 5 Tage alte Maus-Embryonen darzustellen (Foster et al., 2002), erschwerte die ständige Magen-Darm-Motorik und die damit verbundenen Überschneidungen die Ultraschalldiagnostik im Hinblick auf eine zuverlässige frühestmögliche Darstellung des Tumors erheblich, so dass als einziger Vorteil der schmerzfreie Untersuchungsgang, der eine zusätzliche Narkose der Tiere nicht notwendig machte, zu nennen ist.

¹¹C-Cholin-PET

PET-Aufnahmen mit ¹¹C-Cholin zur Tumordetektion in der Harnblase zeigten bereits 1 min nach i.v. Injektion eine Anreicherung des ¹¹C-Cholin in Leber, Niere und Blase der Maus, und zwar sowohl in einer tumortragenden als auch in einer gesunden Blase, so dass jeglicher Rückschluss auf ein mögliches Tumorwachstum ausgeschlossen war. Obwohl die ¹¹C-Cholin-PET hervorragende Resultate in der Humanmedizin bei der Detektion von Rezidiven nach Resektion urologischer Tumoren wie dem Prostata- und Blasen-Ca zeigt (De Jong et al., 2003; Rinnab et al., 2007), erwies sie sich im Mausmodell aufgrund der sehr raschen Ausscheidung von Cholin in die murine Blase als ungeeignet für den Nachweis orthotopen Tumorwachstums. Zudem ist die ¹¹C-Cholin-PET aufgrund des hohen personellen und zeitlichen Aufwandes, den die erforderliche Anästhesie und Blasenkatheterisierung der Tiere mit nahezu zeitgleich erfolgender i.v. Injektion des Tracers und parallelem Start der Bildaufnahme mit sich bringt, nicht für Routineuntersuchungen der Mäuse geeignet.

Immunhistochemie

Die Überexpression des EGF-Rezeptors der Zelllinie EJ 28-luc konnte immunhistochemisch am xenotransplantierten Urothel-Karzinom in der Mäuseblase nachgewiesen werden. Der Nachweis der Überexpression des EGFR ist zum einen von Bedeutung, da schon früh erkannt wurde, dass eine Dysregulation dieses Wachstumsrezeptors sehr häufig zur Ausprägung unterschiedlicher Tumoren führt (Aaronson 1991). Auch Theodorescu u. Mitarb. (1998) belegten in ihrer Studie, dass

der EGFR-Signalweg die Motilität und somit das Invasionspotential der Urothelkarzinomzellen unterstützt. In dieser Studie diente der EGFR ausschliesslich als Zielstruktur für die Radioimmuntherapie, so dass der immunhistochemische Nachweis des EGFR vor allem die Identifikation von Tumorzellen in der murinen Blase bezweckt.

Wie in Abb. 32 und 33 gezeigt, sind die EGF-Rezeptoren der Tumorzellen intensiv braun gefärbt, während die unveränderten Anteile des Urothels durch eine Gegenfärbung blau dargestellt sind. Auf diese Weise liessen sich auch im seltenen Fall von sich entwickelnden Nierentumoren über die Ureteren retrograd aufgestiegene Tumorzellen in der Niere nachweisen. Solche Tiere zeigten zudem in Optical Imaging Aufnahmen ein starkes Biolumineszenzsignal in der Nierenregion, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei um Zellen der verwendeten Linie EJ 28-luc handelt. Auch Hadaschik u. Mitarb. (2007) begründen in ihrem Modell die gelegentlich auftretenden Nierentumoren durch vesikoureterialen Reflux mit nachfolgender intrarenaler Tumorumplantation. Durch eine Verminderung des Zellinstillationsvolumens von 100 µl auf 50 µl trat dieses Problem nicht mehr auf.

Die immunhistochemische Anfärbung des EGF-Rezeptors ist relevant in der Beurteilung des Erfolges der zielgerichteten Therapie des Tumors (Arnes et al., 2008). Bei der histopathologischen Aufarbeitung der murinen Blasen nach Therapie kann der Pathologe über die immunhistochemische Anfärbung des EGFR verbliebene Tumorzellen detektieren.

5.3 Bioverteilung und Toxizität des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK

Es existiert keine Wirkung ohne Nebenwirkung, so kann die Radioimmuntherapie durch ihre Strahlung Tumoren heilen als auch toxische Effekte hervorrufen. Untersuchungen und Dokumentationen zur Bioverteilung sind wichtige Grundlagen für die Dosimetrie und ermöglichen erst die Beurteilung von therapeutischer Effizienz und Toxizität des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK.

Die Biokinetik des Radioimmunkonjugates wurde mittels Biodistributionsstudien nach unterschiedlicher Applikationsform untersucht und bietet die Möglichkeit, die Anreicherung des RIK im Tumor und im gesunden Gewebe zu beurteilen. Da in der vorliegenden Arbeit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK intravesikal instilliert wurde, konnte in einer Biodistributionsstudie an unbehandelten Mäusen gezeigt werden, dass die lokoregionale Applikation in die Blase aufgrund der hervorragenden Retention in diesem Organ zu keiner systemischen Verteilung geführt hat (Abb. 21). Es konnte lediglich eine sehr geringe Menge an ^{213}Bi -Aktivität in der Niere nachgewiesen werden, vermutlich verursacht durch einen retrograden Aufstieg über die Ureteren aufgrund des intravesikalen Drucks während der therapeutischen Instillation.

Etwas anders sah es in der Biodistribution nach intravesikaler Instillation bei gekauterten Tieren aus. Hier war unmittelbar nach Kauterung und der damit verbundenen Läsion des Urothels ein Blutanschlussweg vorhanden, so dass es dort trotz guter Retention in der Blase zu einer systemischen Verteilung des RIK kam. Frühere Arbeiten zur systemischen Verteilung des RIK nach i.p. Injektion im Mausmodell (Beck et al. 2007) belegen, dass sich bei sehr geringen Aktivitäten keine toxischen Auswirkungen zeigen. Dementsprechend konnten bei der Sektion der Tiere aus der vorliegenden Studie auch keine pathologischen Veränderungen der Organe nach der Therapie mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten festgestellt werden. Bei entsprechender Verringerung des intravesikalen Drucks in der murinen Blase durch z.B. ein verkleinertes Instillationsvolumen sollte auch der retrograde Aufstieg über die Ureteren zu vermindern, bzw. ganz zu vermeiden sein.

Eine weitere Biodistributionsstudie wurde nach i.v. Injektion von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK durchgeführt und es zeigte sich die erwartete hohe Aktivitätskonzentration des RIK sowohl im Blut als auch in allen Organen mit starker Blutversorgung wie Herz, Lunge, Leber, Nieren und Milz, wie sie für intakte Antikörper beschrieben ist. Die Verteilung ^{213}Bi -markierter Antikörper nach i.v. Injektion in tumorfreie Mäuse ist bereits beschrieben worden (Beck et al., 2007) und wird nicht wesentlich von der Chelatierung des Antikörpers beeinflusst (Seidl und Senekowitsch-Schmidtke, 2008, Senekowitsch-Schmidtke et al., 2001). Unterschiede im Verteilungsmuster des ^{213}Bi in tumorfreien Tieren sind, bedingt durch die Retention von ungebundenem ^{213}Bi zu den Nieren beschrieben (Huber et al., 2003, Fischer, 2001). Diese spielen in dieser

Studie jedoch eine untergeordnete Rolle, da bei den Markierungsprozessen mit ^{213}Bi durchweg Markierungsausbeuten über 95% erzielt wurden (vergl. 4.1).

Die Bindung des AK an das EGFR-überexprimierende Urothelkarzinom war nach i.v. Injektion deutlich geringer als nach intravesikaler Applikation, welches den Aussagen von Huber (2003) entspricht, wonach isolierte, in präformierten Körperhöhlen befindliche Tumorzellverbände von i.v. applizierten RIK schlecht erreicht werden. Die unmittelbare Zugänglichkeit des RIK zu den Antigenen der Tumorzellen wird durch die lokoregionale Applikation in die murine Blase ermöglicht.

Die maximale RIK-Konzentration im Blut nach i.p. Injektion wird bei Mäusen bei intaktem IgG-Antikörper nach 2 h erreicht (Rowlinson et al., 1987), beim Menschen dagegen erst nach 24 h (Epenetos et al., 1987), also nach ca. 32 Halbwertszeiten des ^{213}Bi . Da bereits 7 Halbwertszeiten ausreichen, um die Radioaktivität auf <1% zu senken, liegt für die Zeit, in der das höchste Toxizitätsrisiko für den Patienten durch eine hohe Aktivitätskonzentration des RIK im Blut bestehen würde, keine Aktivität mehr vor. Blutuntersuchungen der Mäuse wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht durchgeführt, da die Radioimmuntherapie intravesikal, also unter Umgehung des Blutweges, vorgenommen wurde. Aufgrund der exzellenten Retention des RIK in der Blase wurde bei den Mäusen keine pathologische Symptomatik nach Instillation des Radioimmunkonjugates, wie z.B. verminderter Hautturgor oder Gewichtsverlust, festgestellt.

Nach intraperitonealer Injektion von ^{213}Bi -Immunkonjugaten als auch von ungebundenem ^{213}Bi konnte aufgrund systemischer Resorption aus dem Bauchraum mit Hilfe von Micro-Imager Aufnahmen eine Akkumulation von ^{213}Bi in der Nierenrinde und der äusseren Markzone nachgewiesen werden. Muskelgewebe aus dem M. quadriceps femoris diente als Negativkontrolle. Sowohl bei freiem als auch bei gebundenem ^{213}Bi zeigte sich ein identisches Verteilungsmuster. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Nierentoxizität durch vom Radioimmunkonjugat freigesetztes ^{213}Bi verursacht wird. Zum einen kann ungebundenes ^{213}Bi , vom Radioimmunkonjugat freigesetzt durch die systemische Resorption aus der Bauchhöhle, in den Einschlusskörperchen der renalen Tubulusepithelzellen retiniert

werden, zum anderen ist das Tubulussystem in der Lage, selektiv ^{213}Bi -Antikörperfragmente mit einem Molekulargewicht von <40 kDa nach enzymatischer Degradation des intakten Antikörpers zu reabsorbieren. Histopathologische Veränderungen der Niere konnten jedoch erst nach intraperitonealer Applikation hoher ^{213}Bi -Aktivitäten von 22 MBq beobachtet werden (Beck et al., 2007). Erkennbar waren bei 160-facher Vergrößerung der Nierenschnitte ödematisierte Tubulusepithelzellen mit vergrößerten Kernen und hyalinisierte Glomerulaschlingen (Abb. 5).

5.4 Therapeutische Effizienz der Radioimmuntherapie

Zunehmend werden Therapien gegen solide Tumoren, die als biologische Zielstruktur den EGF-Rezeptor verwenden, erforscht. Diese anti-EGFR-MAK werden sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Bestrahlung oder Chemotherapie gegen aggressive Tumoren, die schlecht auf alleinige Chemotherapie ansprechen, verwendet. Am ausgiebigsten aller monoklonalen anti-EGFR-Antikörper ist Cetuximab (Erbix) untersucht (Rocha-Lima et al., 2007).

Die Behandlung humaner Blasenkarzinom-Xenotransplantate mit unkonjugiertem anti-EGFR-MAK Cetuximab zeigte eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums (Bellmunt et al., 2003). Der native humanisierte anti-EGFR-MAK Matuzumab (EMD 72000) verhinderte durch kompetitive Hemmung eine Bindung des natürlichen Liganden EGF an den EGFR (Seiden et al., 2007) und blockierte auf diese Weise die Liganden-induzierte Rezeptoraktivierung (Schmiedel et al., 2008). Derzeit wird Matuzumab in klinischen Phase I und II Studien an Patienten mit EGFR-positivem kleinzelligen Lungenkarzinom (Kollmannsberger et al., 2006), Ovarialkarzinom und primär malignen Erkrankungen des Peritoneums (Seiden et al., 2007) eingesetzt.

Obwohl gezeigt worden ist, dass EGFR-Antikörper Apoptosevorgänge in ausgewählten Tumorzellen induzieren, ist der Effekt dieser Antikörper jedoch eher zytostatischer als zytotoxischer Natur (Laskin and Sandler, 2004). Phase I Dosis-Eskalations-Studien mit Matuzumab zeigten nach intravenöser Injektion des nativen

Antikörpers (400 – 1.600 mg/Patient/Woche) einen Anti-Tumor-Effekt ohne kumulierende Toxizität (Vanhoefer et al., 2004). Dennoch wurde von den verantwortlichen Herstellern angekündigt, dass Matuzumab in den klinischen Phase II-Studien beim metastasierenden Kolorektalkarzinom den erwarteten Endpunkt für die Wirksamkeit nicht erreichte (Information Merck Serono, 30.08.2007).

In dieser Studie dient Matuzumab ausschliesslich als Carrier, der mit einer Affinität von 0,95 nM an die EGFR überexprimierende Zelllinie EJ 28-luc bindet, um so zytotoxische Radionuklide selektiv an die Tumorzelle zu bringen und diese abzutöten.

In klinischen Phase I Studien wurde die hohe therapeutische Effizienz der α -Strahler, gekoppelt an Antikörper, sowohl in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie als auch des Melanoms, Ovarialkarzinoms und malignen Glioms bewiesen (Jurcic 2005; Raja et al., 2007; Hultborn et al., 2007; Zalutsky et al., 2008). Erste erfolgreiche Therapieversuche mit tumorspezifischen ^{213}Bi -gekoppelten Antikörpern sind bereits in einem humanen transfizierten Mammakarzinom (MDA)-Modell sowie mit xenotransplantierten humanen Magenkarzinomzellen (HSC) beschrieben worden (Fischer, 2001; Huber, 2003). Bislang stehen jedoch keine therapeutischen Studien mit ^{213}Bi gekoppelten anti-EGFR-Antikörpern zur Verfügung. Es ist belegt, dass ^{213}Bi -Immunkonjugate nach intraperitonealer Injektion sehr effektiv in der Behandlung der disseminierten Peritonealkarzinose sind (Beck et al., 2007; Seidl und Senekowitsch-Schmidtke, 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intravesikale Applikation von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK zu verschiedenen Zeitpunkten nach Instillation von Blasentumorzellen das Tumorwachstum nicht nur hocheffizient verhindert hat sondern sogar bereits bestehende Blasentumoren wirksam reduzieren konnte.

Die Standardtherapie des Urothelkarzinoms besteht, wie bereits erwähnt, in der transurethralen Resektion (TUR) des Tumors, chemotherapeutisch ergänzt durch unmittelbare intravesikale Instillation des zytostatisch wirkenden Antibiotikums Mitomycin C. Mitomycin C behindert als alkylierende Substanz die Replikation der DNA und soll der Ausbildung früher Rezidive nach TUR entgegenwirken (Krämer, 2005). Der Nachteil einer Chemotherapie liegt jedoch in ihrer unspezifischen Wirkung, da sie alle sich schnell teilenden Zellen sowohl die des Tumors als auch die

des gesunden Gewebes abtötet. In dieser Studie stellte sich zudem heraus, dass durch intravesikale Instillation von Mitomycin C nephrotoxische Nebenwirkungen bei den Mäusen hervorgerufen wurden. Die nekrotisierenden Eigenschaften von Mitomycin C sind bekannt und nicht selten resultieren diese in ernsthaften Komplikationen der Nierenfunktion wie z. B. Entzündung der Ureteren mit nachfolgender Stenose (Bolenz et al., 2006). Liu u. Mitarb. (2003) wiesen die Induktion von Apoptose und Nekrose durch hohe Mitomycin C-Konzentrationen (200 µg/ml) in Urothelkarzinom-Zellen nach, während geringere Konzentrationen (50 µg/ml) vornehmlich apoptotische Vorgänge bewirkten. Überdies zeigte sich in in vitro-Studien ein heterogenes Ansprechen verschiedener humaner Blasenkarzinom-Proben auf die Therapie mit Mitomycin C (Schmittgen et al., 1991). Obwohl die intravesikale Applikation von Mitomycin C nach TUR eine Reduktion der Tumorrezidive um 14 – 17% erzielte, hat die Chemotherapie nur begrenzte Möglichkeiten, wenn es um das Aufhalten der Tumorprogression und einer Fernmetastasierung geht (Pawinski et al., 1996; Malkowicz, 2006).

Wie die Überlebensdaten der Kaplan-Meier-Diagramme dieser Arbeit zeigen, ist die therapeutische Effizienz von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk jener von Mitomycin C deutlich überlegen, jedoch nahm die Effizienz der Radioimmuntherapie mit steigender Zeitspanne zwischen Tumorzell-Instillation und der Applikation der ^{213}Bi -Immuntherapie ab.

In einer vorangegangenen Studie der eigenen Arbeitsgruppe wird von einer verbesserten Wirksamkeit bei der intraperitonealen Behandlung des diffusen Magenkarzinoms mit α -Radioimmuntherapie berichtet, bei der sich zeigte, dass die mehrfache, fraktionierte Gabe niedriger Aktivitäten eines ^{213}Bi -gekoppelten Antikörpers einer einmaligen i.p. Applikation gleicher Aktivität überlegen ist (Bloechl et al., 2005).

Bei fortgeschrittenen Blasentumorstadien 14 Tage nach Zellinstillation könnte sicherlich eine deutlich verbesserte Wirksamkeit der α -Radioimmuntherapie erzielt werden, wenn die intravesikale Therapie fraktioniert, z.B. in wiederholter wöchentlicher Applikation kleinerer Aktivitäten des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk, angewendet wird.

Vereinzelt trat bei Tieren der vorliegenden Studie, die 7 Tage nach intravesikaler Zellinstillation eine Therapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk erhielten, der Fall auf, dass sie bei einer Messung im Optical Imaging eine Woche nach Therapie kein Tumor-Biolumineszenzsignal mehr zeigten und auch bei nachfolgenden Messungen als tumorfrei galten. Bei Todesfällen vor dem 300. Überlebenstag zeigten sich bei Sektionen jedoch wieder manifeste Blasenkarzinome. Es ist bei diesen Fällen denkbar, dass der therapierte Tumor nach 7 Tagen bereits so groß war, dass die zentral liegenden Zellen vom α -Emitter ^{213}Bi nicht mehr erreicht und abgetötet werden konnten, gleichzeitig jedoch in ihrer Anzahl so gering waren ($<1 \times 10^3$ Zellen), dass sie im Biolumineszenz Imaging nicht mehr darstellbar waren. Solche Fälle unterstreichen die Bedeutung einer fraktionierten intravesikalen Therapie.

Wie bereits erwähnt, besitzt der anti-EGFR-Antikörper (Matuzumab), wenn er in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt wird, auch ohne gekoppeltes zytotoxisches Agens einen Antitumor-Effekt. Daher wurde er in Studien zur Behandlung des EGFR-positiven nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (Kollmannsberger et al., 2006) und Ovarialkarzinoms eingesetzt (Seiden et al., 2007). Dennoch konnte die Eliminierung dieser Tumorzellen erst nach intravenöser Gabe sehr hoher Mengen (400 – 1.600 mg/ Patient / Woche) des nativen Antikörpers beobachtet werden. Diese Menge würde einer Gabe von ca. 0,125 – 0,5 mg pro Maus entsprechen und wäre somit ungefähr 100-fach höher als die tatsächlich applizierte Antikörper-Menge bei der intravesikalen ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk Instillation in der vorliegenden Studie. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Antitumor-Effekt der ^{213}Bi -anti-EGFR-Therapie aufgrund der hochenergetischen α -Strahlung von ^{213}Bi erfolgt und nicht durch den Anti-EGFR-Antikörper verursacht wird.

In einer eigenen Studie wird derzeit im Mausmodell ein möglicher Einfluss des intravesikal instillierten unmarkierten anti-EGFR-MAk auf das Wachstum des EJ 28-luc-Urothelkarzinoms untersucht. Ein notwendig gewordenes frühzeitiges Euthanasieren der Tiere aufgrund progressiven Tumorwachstums deutet bereits darauf hin, dass die eingesetzte geringe Menge des anti-EGFR-MAk von $2\mu\text{g}$ keinen zytotoxischen Einfluss auf die Tumorzellen hat. Es zeichnet sich ab, dass es kaum einen Unterschied der Überlebenszeiten zur untherapierten Kontrollgruppe gibt.

Therapeutische Studien an Mäusen mit dem intraperitoneal injizierten α -Emitter ^{211}At , gebunden an unspezifische Antikörper sowie mit freiem ^{211}At , ergaben eine geringfügige therapeutische Wirkung des ungebundenen ^{211}At (Larsen et al., 1995). Vermutlich würde die intravesikale Instillation von ungebundenem ^{213}Bi in die murine Blase auch einen geringfügigen Einfluss auf die Tumorzellen ergeben, da die α -Strahlung in der sehr kleinen Mäuseblase auch diejenigen Strukturen erreichen könnte, an welche das RIK nicht bindet. Da diese Instillationstherapie jedoch in der Humanmedizin angewendet werden soll, ist das Ziel für die Entwicklung einer Tumorthherapie mittels Radionuklid-markierter Trägersubstanzen, die Bindung des α -Strahlers unmittelbar an die Tumorzelle zu steigern und zugleich im gesunden Gewebe so gering wie möglich zu halten (Buchsbaum, 1997).

Die intravesikal instillierte α -Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-Antikörpern hat in dieser Studie die disseminierten Blasentumorzellen im Mausmodell erfolgreich abgetötet und somit ein Anheften der Zellen an die Urothelläsion verhindert, ebenso konnten bereits etablierte Tumoren in der Mäuseblase eliminiert, bzw. in ihrem Wachstum gehemmt werden. Das Überleben der therapierten Tiere in dieser Studie konnte hochsignifikant verlängert werden, die Tiere erreichten nach der Therapie ein tumorfreies Überleben von >300 Tagen, welches der Lebenserwartung einer gesunden Maus entspricht. Von Flanagan wurde 1966 die natürliche Lebenserwartung einer homozygoten Nacktmaus mit 244-275 Tagen festgesetzt, mittlerweile verzeichnet die Zuchtanstalt Charles River Sulzfeld sogar, dass die Hälfte aller Nacktmäuse, die in ihren Stallungen eines natürlichen Todes sterben, den 21. Lebensmonat (ca. 630 Tage) erreichen.

Überdies zeigte diese Studie eine eindrucksvolle 100% *response rate* der xenotransplantierten Tumoren auf die ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk -Therapie. Dieser neue therapeutische Ansatz hebt sowohl die besondere Herausforderung der Etablierung eines nicht-invasiven orthotopen Xenotransplantats in die Mäuseblase hervor, wie auch die Vorteile des frühzeitig lokoregional instillierten ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk ohne erkennbare Nebenwirkungen.

Ausblick

Es bleibt zu hoffen, dass die vorliegende Arbeit die Entwicklung der α -Radioimmuntherapie weiter voranbringt, um Patienten nach der transurethralen Resektion eines Urothelkarzinoms mit dieser vielversprechenden Therapie wirkungsvoll vor einem Rezidiv zu schützen. Die herausragende Wirksamkeit ^{213}Bi -gekoppelter Antikörper bei der Bekämpfung disseminierter Tumorzellen verschiedener onkologischer Entitäten ist in unterschiedlichen Tiermodellen ausführlich belegt worden. Präformierte Körperhöhlen wie die Harnblase bieten durch ihr Retentionsvermögen den Vorteil von nur minimalen Nebenwirkungen des Therapeutikums, da dieses nicht in den Blutkreislauf resorbiert wird und daher dosislimitierende Organe wie Nieren und Knochenmark geschont werden.

Letztendlich sollen jedoch nicht Mäuse vom Urothelkarzinom geheilt werden, sondern diese neue Therapieoption soll dem Menschen zum Vorteil gereichen. Bischof-Delaloye (2000) äusserte die Erwartung, dass die erfolgreiche Radioimmuntherapie Teil der Standardtherapie bei Krebspatienten wird. Aufgrund der grossen Erfahrung der Kliniker bei der Durchführung intravesikaler Chemotherapien sollten zukünftige adjuvante Blasenspültherapien mit einem Radioimmunkonjugat sehr gut zu realisieren sein, zumal sich bei Patienten aufgrund der größeren Organverhältnisse der Zugang einfacher gestaltet und sich durch das größere Blasenvolumen der intravesikale Überdruck und somit der ureteriale Reflux in die Nieren vermeiden lässt.

Es ist an der Zeit, die im Tiermodell erfolgreich eingesetzte α -Radioimmuntherapie in klinischen Studien am Patienten durchzuführen. Die in diesem Modell gewonnenen Ergebnisse auf die Situation des Patienten zu übertragen, stellt den nächsten herausfordernden Schritt für Onkologen, Urologen und Nuklearmediziner dar. Eine vollständige, rezidivfreie Heilung dieser Erkrankung kann mit der α -Radioimmuntherapie in greifbare Nähe rücken und sollte daher das Ziel zukünftiger klinischer Forschung sein.

„Man merkt nie, was schon getan wurde; man sieht immer nur das, was noch zu tun bleibt.“

Marie Curie

6 ZUSAMMENFASSUNG

Etablierung des humanen Harnblasenkarzinoms im orthotopen Mausmodell zur Bewertung der intravesikalen Radioimmuntherapie mit einem Wismuth-213 (^{213}Bi) markierten monoklonalen anti-EGFR-Antikörper

In der Therapie des Urothelkarzinoms treten nach transurethraler Resektion (TUR) in nahezu 80% aller Fälle Rezidive durch disseminierte Tumorzellen auf. Die sofortige Instillation von Mitomycin C reduziert diese Rezidivrate zwar um 39%, dennoch kommt es zu einem Wiederauftreten des Blasentumors bei 15–40% aller Patienten innerhalb von 5 Jahren nach TUR. Ziel dieser Studie war daher die Entwicklung eines orthotop xenotransplantierten Mausmodells zur Bewertung einer neuen adjuvanten Therapiestrategie. Die zur Modelletablierung verwendete Luciferase-transfizierte humane Blasenkarzinom-Zelllinie EJ 28-luc weist mit $5,1 \times 10^5$ EGFR-Molekülen pro Zelle eine deutliche Überexpression des EGF-Rezeptors auf. Eine Überexpression des EGFR wird in bis zu 86% aller Urothelkarzinome beobachtet. Als therapeutisches Agens wurde der hoch zytotoxische α -Emitter ^{213}Bi (HWZ 45,6 min), gekoppelt an einen monoklonalen anti-EGFR-MAk (EMD 72000), verwendet. Aufgrund einer geringen Reichweite im Gewebe von ca. 50-90 μm und einem hohen linearen Energietransfer (LET) von 60-150 keV/ μm eignen sich die von ^{213}Bi emittierten α -Partikel zur effizienten Abtötung einzelner Tumorzellen oder kleiner Tumore. Zur Bewertung der therapeutischen Effizienz sowie der Toxizität der ^{213}Bi -anti-EGFR-Konjugate wurden Tumorentwicklung und Überleben orthotop xenotransplantierte Tiere nach intravesikaler Instillation der Radioimmunkonjugate untersucht.

Zur Erfassung der Tumorentwicklung wurden nicht invasive bildgebende Verfahren wie Ultraschall, ^{11}C -Cholin-PET und Biolumineszenz Imaging verglichen. Ausschliesslich mittels Biolumineszenz Imaging liess sich eine Tumormanifestation ab dem 7. Tag nach intravesikaler Zellinstillation sowie eine posttherapeutische Tumorregression zuverlässig nachweisen. So betrug die Tumorangehrate nach intravesikaler Instillation der EJ 28-luc Zellen nahezu 80%. Die Biodistribution von ^{213}Bi -anti-EGFR-Konjugaten, welche hochspezifisch an EJ 28-luc Zellen binden, wurde nach intravesikaler Instillation an tumorfreien und an tumortragenden Tieren

untersucht. Dabei zeigte sich eine sehr gute Retention des Radioimmunkonjugats in der Blase mit vernachlässigbarer systemischer Verteilung.

Die therapeutische Effizienz der ^{213}Bi -anti-EGFR-Konjugate wurde in Abhängigkeit von der applizierten ^{213}Bi -Aktivität und dem Zeitpunkt der Applikation nach intravesikaler Instillation der Tumorzellen im Vergleich zu einer untherapierten Kontrollgruppe ermittelt. Der Median der Überlebenszeit der Tiere, die mit 0,37 bzw. 0,925 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk 1 h nach Zellinstillation therapiert wurden, lag mit >300 d hochsignifikant über dem Median des Überlebens untherapierter Kontrolltiere von nur 41 d. Bei intravesikaler Instillation von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk am Tag 7 nach Zellinokulation lag der Median der Überlebenszeit bei Applikation von 0,925 MBq ebenfalls bei >300 Tagen, während sich bei 0,37 MBq kein signifikanter Unterschied zum Überleben der Kontrollgruppe ergab (medianes Überleben 49 d). Bei Einsatz von 0,925 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk 14 d nach Zellinstillation betrug der Median der Überlebenszeit 55 d. Demnach sind die Tumore 14 d nach Zellinstillation grösser als die Reichweite der α -Partikel, so dass nicht alle Zellen abgetötet werden konnten. Die intravesikale Therapie mit Mitomycin C 1 h bzw. 7 d nach Zellinstillation bewirkte mit 289 d bzw. 251 d ebenfalls ein signifikant verlängertes medianes Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch zeigten sich bei diesen Tieren pathologische Veränderungen der Niere in Form von Nephrozirrhosen, die nach Therapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk nicht beobachtet wurden.

Intravesikal instilliertes ^{213}Bi -anti-EGFR-Radioimmunkonjugat erwies sich als sehr effektiv in der Abtötung disseminierter Tumorzellen und verursachte keine makroskopisch erkennbare Schädigung des murinen Urothels. Diese Studie zeigte hochsignifikant verlängerte Überlebenszeiten der mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk behandelten Tiere ohne toxische Nebenwirkungen. Daher könnte sich der Einsatz intravesikal instillierter ^{213}Bi -anti-EGFR-Radioimmunkonjugate in Patienten mit Harnblasenkarzinom nach TUR als vielversprechend im Hinblick auf ein rezidivfreies Überleben erweisen.

7 SUMMARY

Establishment of human urothelial carcinoma in an orthotopic mouse model for evaluation of intravesical radioimmunotherapy using a ^{213}Bi labeled monoclonal anti-EGFR antibody

In therapy of urothelial carcinoma a recurrence rate of 80% after transurethral resection (TUR) due to disseminated tumor cells is a major problem. Even though immediate instillation of mitomycin C reduces recurrence risk by 39%, 15 - 40% of those patients still suffer from tumor recurrence within 5 years after TUR. The aim of this study was to establish an orthotopic xenografted mouse model for evaluation of a new adjuvant therapeutic strategy. The luciferase-transfected human bladder carcinoma cell line EJ 28-luc used for this xenograft model reveals EGF-receptor overexpression with 5.1×10^5 EGFR molecules per cell. EGFR-overexpression has been observed in up to 86% of all urothelial carcinomas analyzed. The highly cytotoxic α -emitter Bismuth-213 (^{213}Bi , half live 45.6 min), coupled to a monoclonal anti-EGFR-MAb (EMD 72000), was used as therapeutic agent. α -particles emitted by ^{213}Bi efficiently eliminate disseminated tumor cells and small tumors due to a short range in tissue of approximately 50-90 μm and a high linear energy transfer (LET) of 60-150 keV/ μm . For evaluation of therapeutic efficacy and toxicity of ^{213}Bi -anti-EGFR conjugates, tumor development and survival of orthotopically xenografted animals were assayed following intravesical instillation of radioimmunoconjugates.

For monitoring of tumor development, non-invasive imaging techniques such as sonography, ^{11}C -choline-PET and bioluminescence imaging were compared. Early tumor manifestation at day 7 after cell instillation as well as tumor regression after therapy could reliably be detected solely by using bioluminescence imaging. Tumor take rate was up to 80% after intravesical instillation of EJ 28-luc cells. Biodistribution of ^{213}Bi -anti-EGFR conjugates that specifically bind to EJ 28-luc cells was determined after intravesical instillation in tumor free and tumor bearing mice. These studies revealed a very high retention of the radioimmunoconjugate in the bladder with negligible systemic activity.

Therapeutic efficacy of ^{213}Bi -anti-EGFR-conjugates was evaluated on the basis of the applied ^{213}Bi -activity and the time of application after intravesical instillation of tumor cells, and compared to a non-treated control group. Median survival of animals treated with 0.37 or 0.925 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAb 1 hour after cell instillation was significantly higher than median survival of the control group (>300 d vs. 41 d). Following intravesical instillation of ^{213}Bi -anti-EGFR-MAb 7 d after cell instillation, median survival exceeded 300 d using 0.925 MBq. Median survival of the group treated with 0.37 MBq 7 d after cell instillation (49 d) did not significantly differ from the untreated controls. After intravesical instillation of 0.925 MBq of ^{213}Bi -anti-EGFR-MAb 14 d post cell instillation the median survival was 55 d. Therefore 14 d after tumor cell instillation the size of the tumor exceeded the range of α -particles, resulting in an incomplete elimination of tumor cells. Intravesical therapy with mitomycin C 1 h and 7 d after cell instillation revealed a significant prolonged median survival of 289 d and 251 d, respectively, compared to the control group. However, animals treated with mitomycin C showed severe pathological alterations of the kidney such as nephrocirrhosis, which did not occur after treatment with ^{213}Bi -anti-EGFR-MAb.

Intravesically instilled ^{213}Bi -anti-EGFR-MAb turned out to be very effective concerning elimination of disseminated tumor cells and did not cause any macroscopic damages of the murine urothelium. This study revealed significantly prolonged survival of animals treated with ^{213}Bi -anti-EGFR-MAb without toxic side effects. Therefore, intravesical application of ^{213}Bi -anti-EGFR-radioimmunoconjugates in patients with urothelial carcinoma after TUR might be a promising treatment option in terms of disease eradication free of recrudescence.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science* 1991; 254(5035): 1146-1153.
- Amling CL. Diagnosis and management of superficial bladder cancer. In: *Current Problems in Cancer* 2001; Mosby Verlag, Vol. 25 (4), 251-3.
- Apostolidis C, Carlos-Marquez R, Janssens W, Molinet R, Nikula T, Quadi A. Cancer treatment using Bi-213 and Ac-225 in radioimmunotherapy. *Nuclear News* 2001; 29-33.
- Apostolidis C, Molinet R, Rasmussen G, Morgenstern A. Production of Ac-225 from Th-229 for targeted alpha therapy. *Anal Chem* 2005; 77:6288-91.
- Arnes JB, Bègin LR, Stefansson IM, Brundet JS, Nielsen TO, Foulkes WD, Akslen LA. Expression of EGFR in relation to BRCA1 status, basal-like markers and prognosis in breast cancer. *J Clin Pathol* 2008 (Epub ahead of print).
- Ballangrud AM, Yang, WH, Palm S, Enmon R, Borchardt PE, et al. Alpha-particle emitting atomic generator (Actinium-225)-labeled trastuzumab (herceptin) targeting of breast cancer spheroids: efficacy versus HER2/neu expression. *Clin Cancer Res* 2004; 10:4489-97.
- Beck R, Seidl C, Pfof B, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Baum H, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. ^{213}Bi -radioimmunotherapy defeats early stage disseminated gastric cancer in nude mice. *Cancer Sci* 2007; 98(8): 1215-22.
- Becker N, Wahrendorf J: *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland/Atlas of Cancer Mortality in the Federal Republic of Germany 1981-1990*. Berlin, Springer Verlag 1997.
- Behr TM, Sharkey RM, Sgouros G, Blumenthal RD, Dunn RM, Kolbert K, Griffiths GL, Siegel JA, Becker WS, Goldenberg DM. Overcoming the nephrotoxicity of radiometal-labeled immunoconjugates: improved cancer therapy administered to a nude mouse model in relation to the internal radiation dosimetry. *Cancer*.1997; 80:2591-610.
- Bellmunt J, Hussain M, Dinney CP. Novel approaches with targeted therapies in bladder cancer. Therapy of bladder cancer by blockade of the epidermal growth factor receptor family. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 46 (Suppl.1):85-104.

- Benesch S, Polo S, Lai FPL, Anderson KI, Stradal TEB, Wehland J, Rottner K. N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *Journal of Cell Science* 2005; 118:3103-3115.
- Benson MC, Olsson CA. Cutaneous continent urinary diversion. In: Walsh PC et al. (eds.), *Campbell's Urology* 8th edition. Saunders, Philadelphia, 2002; 3789-3834.
- Bethge WA, Wilbur DS, Sandmaier BM. Radioimmunotherapy as non-myeloablative conditioning for allogeneic marrow transplantation. *Leuk Lymphoma* 2006; 47:1205-14
- Bier H, Hoffmann T, Hauser U, Wink M, Öchler M, Kovar A, Musar M, Knecht R. Clinical trial with escalating doses of the antiepidermal growth factor receptor humanized monoclonal antibody EMD 72000 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; 47:519-24.
- Bischof-Delaloye A. Radioimmunoimaging and radioimmunotherapy: will these be routine procedures? *Semin Nucl Med* 2000; Jul; 30(3):186-94.
- Black PC, Dinney CPN. Bladder cancer angiogenesis and metastasis – translation from a murine model to clinical trial. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26:623-34.
- Bloechl S, Beck R, Seidl C, Morgenstern A, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Fractionated locoregional low-dose radioimmunotherapy improves survival in a mouse model of diffuse-type gastric cancer using a ²¹³Bi-conjugated monoclonal antibody. *Clin Cancer Res* 2005; 11:7070S-4S.
- Bokoch GM, Der CJ. Emerging concepts in the *Ras* superfamily of GTP-binding proteins. *FASEB J* 1993; 7:750-759.
- Bolenz C, Cao Y, Arancibia MF, Trojan L, Alken P, Michel MS. Intravesical mitomycin C for superficial transitional cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006; 6(8):1273-82.
- Bonfil RD, Russo DM, Schmilovich AJ, Garcia-Palazzo IB. Intravesical therapy with vinorelbine tartrate: antitumor activity in orthotopic murine cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1997; 158:912-5.
- Borchardt PE, Yuan RR, Miederer M, McDevitt MR, Scheinberg DA. Targeted actinium-225 *in vivo* generators for therapy of ovarian cancer. *Cancer Res* 2003; 63:5084-90.

- Boyle P and Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16:481-88.
- Brechbiel MW, Gansow OA. Backbone-substituted DTPA ligands for ^{90}Y radio-immunotherapy. *Bioconjug Chem.* 1991;2(3):187-94.
- Brechbiel MW. Targeted α -therapy: Past, present, future? *Dalton Trans* 2007; 4918-28.
- Brennan P, Bogillot O, Cordier S, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 2000; 86: 289-94.
- Brockhoff G, Hofstaedter F, Kneuchel R. Flow cytometric detection and quantitation of the epidermal growth factor receptor in comparison to scatchard analysis in human bladder carcinoma cell lines. *Cytometry* 1994; 17:75-83.
- Brunner A, Prelog M, Verdorfer I, Tzankov A, Mikuz G, Ensinger C. EpCAM is predominantly expressed in high grade and advanced stage urothelial carcinomas of the bladder. *J Clin Pathol.* 2008; 61(3):307-10.
- Buchhorn HM, Seidl C, Beck R, Saur D, Apostolidis C, Morgenstern A, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Non-invasive visualization of the development of peritoneal carcinomatosis and tumour regression after ^{213}Bi -radioimmunotherapy using bioluminescence imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; 34(6):841-9.
- Buchsbaum DJ. Experimental tumor targeting with radiolabeled ligands. Presented at the Sixth Conference on Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy of Cancer. *Supplement to Cancer*, 1997;80:2371-77.
- Camera L, Kinuya S, Garmestani K, Wu C, Brechbiel MW, Pai LH, McMurry TJ, Gansow OA, Pastan I, Paik CH, et al. Evaluation of the serum stability and in vivo biodistribution of CHX-DTPA and other ligands for yttrium labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med.* 1994; 35:882-9
- Caron PC, Co MS, Bull MK, Avdalovic NM, Queen C, Scheinberg DA. Biological and immunological features of humanized M195 (anti-CD33) monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1992;52(24):6761-7.
- Cheng J, Huang H, Zhang ZT, Shapiro E, et al. Overexpression of epidermal growth factor receptor in urothelium elicits urothelial hyperplasia and promotes bladder tumor growth. *Cancer Res* 2002; 62:4157-63.

- Cherel M, Davodeau F, Kraeber-Bodere F, Chatal JF. Current status and perspectives in alpha radioimmunotherapy. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 50:322-9
- Co MS, Avdalovic NM, Caron PC, Avdalovic MV, Scheinberg DA, Queen C. Chimeric and humanized antibodies with specificity for the CD33 antigen. *J Immunol.* 1992;148(4):1149-54.
- Couturier O, Supiot S, Degraef-Mougin M, Faivre-Chauvet A, Carlier T, et al. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32:601-14.
- Dalbagni G and Herr HW. Current use and questions concerning intravesical bladder cancer group for superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am* 2000; 27:137-46.
- De Bruijn EA, Sleeboom HP, van Helsdingen PJ, van Oosterom AT, Tjaden UR, Maes RA. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravesical mitomycin C upon different dwelling times. *Int J Cancer* 1992 May 28; 51(3):359-64.
- De Jong IJ, Pruim J, Elsinga PH, Vaalburg W, Mensink HJ. 11C-choline positron emission tomography for the evaluation after treatment of localized prostate cancer. *Eur Urol* 2003; Jul 44 (1):32-8; discussion 38-9.
- Edinger M, Sweeney TJ, Tucker AA, Olomu AB, Negrin RS, Contag CH. Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *eoplasia*.1999;1:303-10.
- Ehrlich, P. The collected Papers of Paul Ehrlich. Vol. 3, 59, Pergamon, London, 1960.
- Elgqvist J, Andersson H, Back, Claesson I, Hultborn R, et al. Alpha-radioimmunotherapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 tumors of variable dimensions: Outcome related to measured tumor size and mean absorbed dose. *J Nucl Med* 2006; 47:1342-50.
- Epenetos AA, Munro AJ, Stewart S, Rampling R, Lambert HE, McKenzie CG, Soutter P, Rahemtulla A, Hooker G, Sivolapenko GB, et al. Antibody-guided irradiation of advanced ovarian cancer with intraperitoneally administered radiolabeled monoclonal antibodies. *J Clin Oncol.* 1987;5:1890-9.
- Fischer K. Experimentelle Studien zur lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorausbreitung am Beispiel des diffusen Magenkarzinoms mit einem tumorspezifischen, an den α -Emitter Bi-213 gekoppelten Antikörper. Diss. Tierärztliche Fakultät LMU München. 2001.

- Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res.* 1966;8:295-309.
- Foster FS, Zhang MY, Zhou YQ, Liu G, Mehi J, Cherin E, Harasiewicz KA, Starkoski BG, Zan L, Knapik DA, Adamson SL. A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice. *Ultrasound Med Biol* 2002; Sep 28(9):1165-72.
- GEKID Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und Robert Koch Institut: Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken 2006.
- Goddu SM, Rao DV, Howell RW. Multicellular dosimetry for micrometastases: dependence of self-dose versus cross-dose to cell nuclei on type and energy of radiation and subcellular distribution of radionuclides. *J Nucl Med.* 1994; 35:521-30.
- Golka K, Goebell PJ, Rettenmeier AW. Ätiologie und Prävention des Harnblasenkarzinoms. *Dtsch Arztebl.* 2007; 104(11):A 719-23.
- Gontero P, Freja B. Actual experience and future development of gemcitabine in superficial bladder cancer. *Ann Oncol* 2006; 17, Suppl.5:123-28.
- Gregory H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* 1975; Sep 25;257(5524):325-7.
- Günther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D, Böhle A. Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49). *Cancer Res* 1999, Jun 15;59(12):2834-7.
- GV-SOLAS, Gesellschaft für Versuchstierkunde. Kriterien zur vorzeitigen Tötung von tumortragenden Mäusen und Ratten im Versuch. Merkblatt 73, Mai 1999.
URL: <http://www.tierschutz-tvt.de/merkblatt73.pdf>
- Hadaschik BA, Black PC, Sea JC, Metvalli AR, Fazli L, Dinney CP, Gleave ME, So AI. A validated mouse model for orthotopic bladder cancer using transurethral tumour inoculation and bioluminescence imaging. *BJU Int* 2007;100:1377-84.
- Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11:689-708.
- Huber R. Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit einem ^{213}Bi gekoppelten tumorspezifischen Antikörper im Mausmodell. Diss Tierärztliche Fakultät LMU München. 2003.

- Huber R, Seidl C, Schmid E, Seidenschwang S, Becker KF, Schuhmacher C, Apostolidis C, Nikula T, Kremmer E, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Locoregional alpha-radioimmunotherapy of intraperitoneal tumor cell dissemination using a tumor-specific monoclonal antibody. *Clin Cancer Res* 2003; 9(Pt.2):3922S-8S.
- Hughes OD, Bishop MC, Perkins AC, Wastie ML, et al. Targeting superficial bladder cancer by the intravesical administration of copper-67-labeled anti-MUC1 mucin monoclonal antibody C595. *J Clin Oncol* 2000; 18:363-70.
- Hultborn R, Andersson H, Bäck T, Divgi C, Elgqvist J, Himmelmann J, Horvath G, Jensen H, Lindegren S, Palm S, Jacobsson L. Pharmacokinetics and dosimetry of ^{211}At -MX35 F(ab')₂ in therapy of ovarian cancer – preliminary results from an ongoing phase I study. (Abstract) 2007; Workshop on Alpha-Emitting Radionuclides in Therapy (Aachen, 28.-29. April 2007).
- Humm JL. A microdosimetric model of astatine-211labeled antibodies for radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1987; 13:1767-73.
- Huneke RB, Pippin CG, Squire RA, Brechbiel MW, Gansow OA, Strand M. Effective alpha-particle-mediated radioimmunotherapy of murine leukemia. *Cancer Res.* 1992; 52:5818-20.
- Hussain S, Plückthun A, Allen TM, Zangemeister-Wittke U. Antitumor activity of an epithelial cell adhesion molecule-targeted nanovesicular drug delivery system. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(11):3019-27.
- Iyer M, Berenji M, Templeton NS, Gambhir SS. Noninvasive imaging of cationic lipidmediated delivery of optical and PET reporter genes in living mice. *Mol Ther.* 2002;6:555-62.
- Jiang F, Zhou XM. A model of orthotopic murine bladder (MBT-2) tumor implants. *Urol Res* 1997; 25:179-82.
- Jurcic JG. Immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep* 2005; 7:339-46
- Jurczok A, Fornara P, Söling A. Bioluminescence imaging to monitor bladder cancer cell adhesion in vivo: a new approach to optimize a syngeneic, orthotopic, murine bladder cancer model. *BJU Int.* 2008 Jan;101(1):120-4.

- Kelly MP, Lee FT, Tahtis K, Smyth FE, Brechbiel MW, Scott AM. Radioimmunotherapy with α -particle-emitting ^{213}Bi -C-functionalized *trans*-cyclohexyldiethylenetriaminepentaacetic acid-humanized 3S193 is enhanced by combination with paclitaxel chemotherapy. Clin Cancer Res 2007;13 (18 Suppl) September 15, 5604-12.
- Kennel SJ, Stabin M, Yoriyaz H, Brechbiel M, Mirzadeh S. Treatment of lung tumor colonies with ^{90}Y targeted to blood vessels: comparison with the alpha-particle emitter ^{213}Bi . Nucl Med Biol. 1999a; 26;1:149-57.
- Kennel SJ, Stabin M, Roeske JC, Foote LJ, Lankford PK, Terzaghi-Howe M, Patterson H, Barkenbus J, Popp DM, Boll R, Mirzadeh S. Radiotoxicity of bismuth-213 bound to membranes of monolayer and spheroid cultures of tumor cells. Radiat Res. 1999b;151:244-56.
- Kettleborough CA, Saldanha J, Heath VJ, Morrison CJ, Bending MM. Humanization of a mouse monoclonal antibody by CDR-grafting: the importance of framework residues on loop conformation. Protein Eng. 1991; 4(7), 773-783.
- Kleinerman DI, Dinney CP, Zhang WW, Lin SH, Van NT, Hsieh JT. Suppression of human bladder cancer growth by increased expression of C-CAM1 gene in an orthotopic model. Cancer Res 1996; 56:3431-5.
- Kobayashi H, Wu C, Yoo TM, Sun BF, Drumm D, Pastan I, Paik CH, Gansow OA, Carrasquillo JA, Brechbiel MW. Evaluation of the in vivo biodistribution of yttrium-labeled isomers of CHX-DTPA-conjugated monoclonal antibodies. J Nucl Med. 1998; 39:829-36.
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256:495-497.
- Kollmannsberger C, Schittenhelm M, Honecker F, Tillner J, Weber D, Oechsle K, Kanz L, Bokemeyer CI. A phase I study of the humanized monoclonal anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody EMD 72000 (matuzumab) in combination with paclitaxel in patients with EGFR-positive advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). Ann Oncol 2006; 17:1007-13.
- Krämer K. Hemmung der humanen Telomerase Reverse Transkriptase-Expression mittels synthetischer Nukleinsäuren in Harnblasenkarzinomzellen. Diss. Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden, 2005.

- Kumar R, Hongming Z, Abass A. PET in the management of urologic malignancies. *Radiol Clin N Am*. 2004; 42:1141-53.
- Kunze D, Wuttig D, Kausch I, Blietz C, Blumhoff L, Burmeister Y, Kraemer K, Fuessel S, Toma M, Schwenzer B, Schwenzer B, Meye A, Grimm MO, Hakenberg OW, Jocham D, Wirth MP. Antisense-mediated inhibition of surviving, hTERT and VEGF in bladder cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2008; 32(5):1049-56.
- Landvogt N, Abenstein M, Beck R, Stollfuss J, Seidl C, Huisman M, Senekowitsch-Schmidtke R. Nicht-invasive Darstellung der Peritonealkarzinose im Mausmodell mittels PET, Biolumineszenz Imaging und MRT. *Nuklearmedizin* 2006; 45:P89.
- Larsen RH, Hoff P, Vergote IB, Bruland OS, Aas M, de Vos L, Nustad K. α -particle radiotherapy with ^{211}At -labeled monodisperse polymer particles, ^{211}At -labeled IgG proteins, and free ^{211}At in a murine intraperitoneal tumor model. *Gynecol Oncol*. 1995;57:9-15.
- Laskin JJ and Sandler AB. Epidermal growth factor receptor: A promising target in solid tumours. *Cancer Treat Rev* 2004; 30(1):1-17.
- Leevers SJ, Paterson HF, Marshall CJ. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 1994; Jun 2;369(6479):411-4.
- Liedl B, Zaak D, Schwaibold H, Hungerhuber E, Zimmermann F, Treiber U, Weiss M. Harnblasenkarzinom. In: *Manual Urogenitale Tumoren*. Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München. 2003; 43-78.
- Liu J, Wang Q, Wang X, Sun Y, Chen XY, Kong Q, Zhang KL, Li H. Apoptosis of bladder cancer cells induced by short-term and low-dose Mitomycin-C: potential molecular mechanism and clinical implication. *Int J Mol Med* 2003; 11:389-94.
- Ma D, McDevitt MR, Finn RD, Scheinberg DA. Rapid preparation of short-lived alpha particle emitting radioimmunopharmaceuticals. *Appl Radiat Isot* 2001; 55:463-70.
- Macklis RM, Kinsey BM, Kassis AL, Ferrara JLM, Atcher RW, Hines JJ, Coleman CN, Adelstein SJ, Burackoff SJ. Radioimmunotherapy with alpha-particle-emitting immunoconjugates. *Science* 1988; 240:1024-26.

- Macklis RM, Lin JY, Beresford B, Atcher RW, Hines JJ, Humm JL. Cellular kinetics, dosimetry and radiobiology of alpha-particle radioimmunotherapy: induction of apoptosis. *Radiat Res.* 1992; 130:220-26.
- Malkowicz SB. The role of intravesical chemotherapy in the treatment of bladder cancer. In Lerner SP, Schoenberg M, Sternberg C (eds.), *Textbook of Bladder Cancer*, Informa Healthcare, London, 2006, 335-340.
- McDevitt MR, Sgouros G, Finn RD, Humm JL, Jurcic JG, Larson SM, Scheinberg DA. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med* 1998; 25:1341-1351.
- McDevitt MR, Barendswaard E, Ma D, Lai L, Curcio MJ, et al. An alpha-particle emitting antibody ($[^{213}\text{Bi}]\text{J591}$) for radioimmunotherapy of prostate cancer. *Cancer Res* 2000; 60:6095-100.
- Mellon K, Wright C, Kelly P, Horn CH, Neal DE. Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer. *J Urol* 1995; 153 (Pt 2):919-25.
- Merck Serono (Pressemitteilung vom 30.08.2007). Merck Serono überdenkt die Weiterentwicklung von Matuzumab bei der Behandlung von Kolorektalkarzinomen URL: <http://www.chemie.de/news/d/68451/>
- Messing EM. Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res* 1990; 50:2530-2537.
- Miederer M, Seidl C, Beyer GJ, Charlton DE, Vranjes-Duric S, Comor JJ, Huber R, Nikula T, Apostolidis C, Schuhmacher C, Becker KF, Senekowitsch-Schmidtke R. Comparison of the radiotoxicity of two alpha-particle-emitting immunoconjugates, terbium-149 and bismuth-213, directed against a tumor-specific, exon 9 deleted (d9) E-Cadherin adhesion protein. *Radiation Research.* 2003;159 (5):612-20.
- Milenic DE, Roselli M, Mirzadeh S, Pippin CG, Gansow OA, Colcher D, Brechbiel MW, Schlom J. In vivo evaluation of bismuth-labeled monoclonal antibody comparing DTPA-derived bifunctional chelates. *Cancer Biother Radiopharm.* 2001;16(2):133-46.
- Mirzadeh S, Kennel SJ. Optimizations of radiolabeling of immunoproteins with Bi-213. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society.* 1996; 212:62-NUCL.

- Mostofi FJ, Davis CJ, Sesterhenn IA. Histological typing of urinary bladder tumours. In World Health Organisation international histological classification of tumours. Springer Berlin Heidelberg New York Tokio (1999).
- Murray A, Simms MS, Scholfield DP, Vincent RM, Denton G, et al. Production and characterization of ^{188}Re -C595 antibody for radioimmunotherapy of transitional cell bladder cancer. *J Nucl Med* 2001; 42:726-32.
- Neal DE, Sharples L, Smith K, Fennelly J, Hall RR, Harris AL. The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer* 1990; 65:1619-25.
- Nikula TK, McDevitt MR, Finn RD, Wu C, Kozak RW, Garmestani K, Brechbiel MW, Curcio MJ, Pippin CG, Tiffany-Jones L, Geerlings MW Sr, Apostolidis C, Molinet R, Geerlings MW Jr, Gansow OA, Scheinberg DA. Alpha-emitting bismuth cyclohexyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J Nucl Med*. 1999; 40:166-76.
- Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, Tanaka M, Kuroda J, Sato K, Yokota A, Segawa H, Toda Y, Kageyama S, Yoshiki T, Okada Y, Maekawa T. Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest* 2005; 115:978-85.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55 (2):74-108
- Pawinski A, Sylvester R, Kurth KH, Bouffieux C, van der Meijden A, Parmar MK, Bijnens L. A combined analysis of European Organization for Research and Treatment of Cancer, and Medical Research Council randomized clinical trials for the prophylactic treatment of stage TaT1 bladder cancer. European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group and the Medical Research Council Working Party on Superficial Bladder Cancer. *J Urol* 1996; 156:1934-40.
- Qu CF, Song EY, Li Y, Rizvi SM, Raja C, Smith R, Morgenstern A, Apostolidis C, Allen BJ. Pre-clinical study of ^{213}Bi labeled PAI2 for the control of micro-metastatic pancreatic cancer. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22:575-86.
- Raja C, Graham P, Abbas Rizvi SM, Song E, Goldsmith H, Thompson J, Bosserhoff A, Morgenstern A, Apostolidis C, Kearsley J, Reisfeld R, Allen BJ. Interim Analysis of Toxicity and Response in Phase 1 Trial of Systemic Targeted Alpha Therapy for Metastatic Melanoma. *Cancer Biol Ther* 2007; 6(6):846-52.

- Retz M, Lehmann J, Röder C, Plötz B, Harder J, Eggers J, Pauluschke J, Kalthoff H, Stöckle M. Differential mucin MUC7 gene expression in invasive bladder carcinoma in contrast to uniform MUC1 and MUC2 gene expression in both normal urothelium and bladder carcinoma. *Cancer Res.* 1998; 58(24):5662-6.
- Rinnab L, Mottaghy FM, Blumstein NM, Reske SN, Hautmann RE, Hohl K, Möller P, Wiegel T, Kuefer R, Gschwend JE. Evaluation of [11C]-choline positron-emission/computed tomography in patients with increasing prostate-specific antigen levels after primary treatment for prostate cancer. *BJU Int* 2007; Oct 100(4):786-93.
- Rizvi SM, Qu CF, Song JY, Raja C, Allen BJ. In vivo studies of pharmacokinetics and efficacy of Bismuth-213 labeled antimelanoma monoclonal antibody 9.2.27. *Cancer Biol Ther* 2005; 4:763-8.
- Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control* 2007; Jul 14(3):295-304.
- Rotterud R, Nesland JM, Berner A, Fossa SD. Expression of epidermal growth factor receptor family in normal and malignant urothelium. *BJU Int* 2005; 95:1344-50.
- Rowlinson G, Snook D, Busza A, Epenetos AA. Antibody-guided localization of intraperitoneal tumors following intraperitoneal or intravenous antibody administration. *Cancer Res.* 1987;47:6528-31.
- Ruegg CL, Anderson-Berg WT, Brechbiel MW, Mirzadeh S, Gansow OA, Strand M. Improved in vivo stability and tumor targeting of bismuth-labeled antibody. *Cancer Res* 1990; 50:4221-4226.
- Rygaard J. Immunodeficiency in nude mice. *In: Bastert GBA. Thymusaplastic nude mice and rats in clinical oncology.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York. 1981, 3-13.
- Sato A, Klaumberg B, Tolwani R. In vivo bioluminescence imaging. *Comp Med* 2004; 54:631-4.
- Schiller, JH. Developments in Epidermal Growth Factor Receptor-Targeting Therapy for Solid Tumors: Focus on Matuzumab (EMD 72000). *Cancer Investigation.* 2007; 26:1, 81-95.
- Schmid E, Hieber L, Heinzmann U, Roos H, Kellerer AM. Analysis of chromosome aberrations in human peripheral lymphocytes induced by in vitro alpha-particle irradiation. *Radiat Environ Biophys.* 1996; 35:179-84.

- Schmiedel J, Blaukat A, Li S, Knöchel T, Ferguson KM. Matuzumab binding to EGFR prevents the conformational rearrangement required for dimerization. *Cancer Cell* 2008; 13 (4):365-73.
- Schmittgen TD, Wientjes MG, Badalament RA, Au JL. Pharmacodynamics of mitomycin C in cultured human bladder tumors. *Cancer Res* 1991; 51:3849-56.
- Seiden MV, Burris HA, Matulonis U, Hall JB, Armstrong DK, Speyer J, Weber JD, Muggia F. A phase II trial of EMD72000 (matuzumab), a humanized anti-EGFR monoclonal antibody, in patients with platinum resistant ovarian and primary peritoneal malignancies. *Gynecol Oncol* 2007; 104:727-31.
- Seidl C, Schröck H, Seidenschwang S, Beck R, Schmid E, Abend M, Becker KF, Apostolidis C, Nikula TK, Kremmer E, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Cell death triggered by alpha-emitting ^{213}Bi -immunoconjugates in HSC45-M2 gastric cancer cells is different from apoptotic cell death. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32:274-85.
- Seidl, C und Senekowitsch-Schmidtke, R. Zielgerichtete Radionuklidtherapie mit α -Emittern – Grundlagen, experimentelle Studien und erste klinische Studien. *Der Nuklearmediziner* 2008; 31:1-12.
- Seitz M, Zaak D, Knöchel-Clarke R, Stief C. Harnblasentumoren: Die neue WHO-Klassifikation 2004. *Urologe A* 2005; 9:1073-86.
- Senekowitsch-Schmidtke R, Schuhmacher C, Becker KF, Nikula TK, Seidl C, Becker I, Miederer M, Apostolidis C, Adam C, Huber R, Kremmer E, Fischer K, Schwaiger M. Highly specific tumor binding of a ^{213}Bi -labeled monoclonal antibody against mutant E-cadherin suggests its usefulness for locoregional α -radioimmunotherapy of diffuse-type gastric cancer. *Cancer Res* 2001; 61:2804-8.
- Sgouros G, Humm JL, McDevitt MR, Kennedy J, Schumaker R, Larson SM, Scheinberg DA,. Bismuth-213 imaging: preclinical characterization of an alpha-particle emitting radionuclide. *J Nucl Med* 1996; 37:78P.
- Shen Z, Shen T, Wientjes MG, O'Donnell MA, Au JLS. Intravesical treatments of bladder cancer: Review. *Pharm Res* 2008, 25(7):1500-10.
- Smakman N, Schaap N, Snijckers CM, Borel Rinkes IH, Kranenburg O. NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, reduces experimental bladder carcinoma outgrowth by inhibiting tumor cell proliferation. *Urology* 2005; 66:434-40.

- Smith JA Jr, Labasky RF, Cockett AT, Fracchia JA, Montie JE, Rowland RG. Bladder cancer clinical guidelines panel summary report on the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1 and T1S). The American Urological Association. *J Urol* 1999; 162:1697-1701.
- Soloway MS, Masters S. Urothelial susceptibility to tumor cell implantation: Influence of cauterization. *Cancer* 1980;46:1158-63.
- Soloway MS, Sofer M, Vaidya A. Contemporary management of stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2002; 167:1573-83.
- Song EY, Abbas Rizvi SM, Qu CF, Raja C, Brechbiel MW, Morgenstern A, Apostolidis C, Allen BJ. Pharmacokinetics and toxicity of (213)Bi-labeled PAI2 in preclinical targeted alpha therapy for cancer. *Cancer Biol Ther.* 2007 Jun;6(6):898-904.
- Stief C, Zaak D, Stöckle M, Studer U, Knuechel R, et al. Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms. *Urologe (Sonderheft)* 2006; 45:90-96.
- Stinchcomb TG, Roeske JC. Survival of alpha particle irradiated cells as a function of shape and size of the sensitive volume (nucleus). *Radiat Prot Dosim.* 1995; 62:157-164.
- Sylvester RJ, Oosterlinck W, van der Meijden APM. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: A meta-analysis of published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2004; 171:2186-90.
- Tanaka M, Gee JR, De La Cerda J, Rosser CJ, Zhou JH, Benedict WF, Grossmann HB. Noninvasive detection of bladder cancer in an orthotopic murine model with green fluorescence protein cytology. *J Urol* 2003; 170:975-8.
- Theodorescu D, Laderoute KR, Gulding KM. Epidermal growth factor receptor-regulated human bladder cancer motility is in part a phosphatidylinositol 3-kinase-mediated process. *Cell Growth Differ* 1998; 9:919-28.
- Tortora G, Gelardi T, Ciardiello F, Bianco R. The rationale for the combination of selective EGFR inhibitors with cytotoxic drugs and radiotherapy. *Int J Biol Markers* 2007; 22(1 Suppl 4):47-52.
- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984; May 31-Jun6;309(5967):418-25.

- Vaidyanathan G, Zalutsky MR. Targeted therapy using alpha emitters. *Phys Med Biol* 1996; 41: 1915-1931.
- Vallbohmer D, Lenz HJ. Epidermal growth factor receptor as a target for chemotherapy. *Clin Colorectal Cancer* 2005; 5 Suppl 1:19-27.
- Van Helsdingen PJ, Rikken CH, Sleetboom HP, de Bruyn EA, Tjaden UR. Mitomycin C resorption following repeated intravesical instillations using different instillation times. *Urol Int* 1988; 43(1): 42-6.
- Vanhoefer U, Tewes M, Rojo F, Dirsch O, Schleucher N, Rosen O, Tillner J, Kovar A, Braun AH, Trabach T, Seeber S, Harstrick A, Baselga J. Phase I study of the humanized antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody EMD72000 in patients with advanced solid tumors that express the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol*. 2004 Jan 1;22(1):175-84.
- Vom Dorp F, Kausch I, Jocham D. Diagnostik und Therapie des nichtinvasiven Harnblasenkarzinoms. *Dtsch Arztebl* 2007; 104:A 797-802.
- Wahl RL. Experimental radioimmunotherapy. A brief overview. *Cancer*. 1994;73: 989-92.
- Watanabe T, Shinohara N, Sazawa A, Harabayashi T, Ogiso Y, Koyanagi T, Takiguchi M, Hashimoto A, Kuzumaki N, Yamashita M, Tanaka M, Grossman HB, Benedict WF. An improved intravesical model using human bladder cancer cell lines to optimize gene and other therapies. *Cancer Gene Ther* 2000; 7:844-51.
- Weiss C, Wolze C, Engehausen DG, Ott OJ, Krause FS, Schrott KM, Dunst J, Sauer R, Rodel C. Radiochemotherapy after transurethral resection for high-risk T1 bladder cancer: An alternative to intravesical therapy or early cystectomy? *J Clin Oncol* 2006; 24:2318-24.
- Werthman PE, Drazan KE, Rosenthal JT, Khalili R, Shaked A. Adenoviral-p53 gene transfer to orthotopic and peritoneal murine bladder cancer. *J Urol* 1996; 155:753-6.
- Wilex AG (Pressemitteilung vom 15.5.2003). Wilex erwirbt neuen Antikörper gegen Krebs von VU University Medical Center Amsterdam.
[URL:http://www.munichnetwork.com/pooled/articles/BF_NEWSART/view.asp?Q=BF_NEWSART_59944](http://www.munichnetwork.com/pooled/articles/BF_NEWSART/view.asp?Q=BF_NEWSART_59944)
- Zafir-Lavie I, Michaeli Y, Reiter Y. Novel antibodies as anticancer agents. *Oncogene* 2007; 26:3714-3733.

-
- Zalutsky MR, Pozzi OR. Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting radionuclides. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 48:289-96.
- Zalutsky MR, Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, McLendon RE, Wong TZ, Bigner DD. Clinical experience with alpha-particle emitting ^{211}At : treatment of recurrent brain tumor patients with ^{211}At -labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *J Nucl Med.* 2008 Jan;49(1):30-8.
- Zhu H, Baxter LT, Jain RK. Potential and limitations of radioimmunodetection and radioimmunotherapy with monoclonal antibodies. *J Nucl Med.* 1997;38:731-41.

9 ANHANG

9.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Charakterisierung der verwendeten Zelllinien	37
Tab. 2:	Übersicht der Therapiegruppen mit intravesikal instillierten humanen Harnblasenkarzinom-Zellen (EJ 28-luc)	53
Tab. 3:	Protokoll Hämalaun / Eosin-Färbung	55
Tab. 4:	Übersicht der ermittelten Werte der Bindungsstudien (%). Angegeben sind Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)	64
Tab. 5:	Bindungs- und Internalisierungskinetik von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk und ^{213}Bi -anti-MUC1-MAk. Bindung (%): Anteil des gebundenen Antikörpers; Internalisierung (%): Internalisierter Antikörper bezogen auf 100% Bindung zu den Zeitpunkten 10, 30 und 60 min	66
Tab. 6:	Median der Überlebenszeiten in Tagen (d) nach Therapie mit ^{213}Bi -Immunkonjugat und Mitomycin C im Vergleich zur untherapierten Kontrolle; jede Gruppe umfasste 10 Tiere, IQA = Interquartilsabstand, n.b. = nicht bestimmt	87

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2004 (Quelle: Schätzung der Dachdokumentation Krebs im Robert Koch-Institut)	3
Abb. 2:	Ausbreitung des Urothelkarzinoms innerhalb der Harnblase und deren Klassifikation entsprechend der Infiltrationstiefe. Tis – <i>carcinoma in situ</i> ; Ta – nichtinvasiver papillärer Tumor; T1 – Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe; T2 – Tumor infiltriert Muskulatur; T3 – Tumor infiltriert perivesikales Gewebe (T3a – mikroskopisch, T3b – makroskopisch); T4 – Tumor infiltriert benachbarte Organe (z.B. Prostata, Uterus, Vagina, Becken- und Bauchwand). (Darstellung modifiziert nach http://www.witthe.ne.jp-urologycancer005.htm)	8
Abb. 3:	Reichweite von α - und β -Teilchen	16

Abb. 4:	Chemische Struktur des in dieser Arbeit verwendeten bifunktionellen Liganden (entnommen aus Kobayashi et al., 1998)	20
Abb. 5:	Glomerula der Niere einer Nacktmaus, 160-fache Vergrößerung; dünne Pfeile: ödematisierte Tubulusepithelzellen mit vergrößerten Kernen; dicke Pfeile: hyalinisierte Glomerulaschlingen (entnommen aus Beck et al., 2007)	23
Abb. 6:	Zerfallsschema von Actinium-225	33
Abb. 7:	Ultraschalldarstellung der mässig gefüllten murinen Harnblase (Kreis)	48
Abb. 8:	Sektionsfoto der weiblichen Maus vor Entnahme der Harnblase	54
Abb. 9:	Bindung der drei ^{213}Bi -markierten Antikörper an die 5 unterschiedlichen Harnblasenkarzinom-Zelllinien (%)	61
Abb. 10:	Bindung des Anti-EGFR-MAk bei Inkubationstemperaturen von 37° und 4°C an die 5 unterschiedlichen Harnblasenkarzinom-Zelllinien (%)	62
Abb. 11:	Bindung des Anti-MUC1-MAk bei Inkubationstemperaturen von 37° und 4°C an die 5 unterschiedlichen Harnblasenkarzinom-Zelllinien (%)	63
Abb. 12:	Grafische Darstellung der Scatchard-Analysen der Zelllinien EJ 28-luc und RT 112 zur Ermittlung der EGF-Rezeptordichte pro Zelle	64
Abb. 13:	Internalisierungskinetik des spezifischen ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk und des unspezifischen ^{213}Bi -anti-MUC1-MAk bei EJ 28 Zellen (ng / 3×10^6 Zellen)	67
Abb. 14:	Sektionsfotos tumortragender Nacktmäuse: a) Blase mit deutlicher Gefässeinsprossung 14 d nach Zellinstillation; b) intravesikales Tumorentstehung 28 d nach Zellinstillation	68
Abb. 15:	Sonographieaufnahmen: a) Harnblase mit Tumor (gelber Pfeil) auf Höhe des Blasenausgangs 18 d p Zellinstillation (Kreis), b) Blase einer unbehandelten Maus (Kreis), Schallauslöschung unterhalb gasgefüllter Darmschlingen (weisse Pfeile)	70
Abb. 16:	Biolumineszenzaufnahmen: Zwei tumortragende Mäuse jeweils 21 d nach Zellinstillation in verschiedenen Aufnahmepositionen, a) ventral, b) lateral, c) dorsal	71
Abb. 17:	Biolumineszenzaufnahmen: Erfassung der Tumorentwicklung a) 7 Tage; b) 14 Tage; c) 21 Tage; d) 28 Tage nach Zellinstillation	72

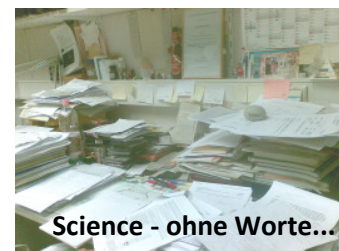
Abb. 18:	Tumortragende Maus 28 d nach Zellinstillation, PET-Aufnahmen 1 min nach i.v. Injektion von 10,5 MBq ^{11}C -Cholin a) Sagittalschnitt; b) Coronarschnitt; c) Transversalschnitt (gelbe Linien entsprechen den Schnittebenen)	73
Abb. 19:	PET-Aufnahme einer a) tumortragenden Maus und b) einer Kontrollmaus, weiße Pfeile zeigen auf die Blase, jeweils links Coronar- und rechts Sagittalschnitt	74
Abb. 20:	Biodistribution nach i.v. Injektion und 45 min Inkubation von 2,96 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK	75
Abb. 21:	Verteilung des RIK nach intravesikaler Instillation von 6,66 MBq in ungekauterte Mäuse, 45 und 90 min nach Instillation	76
Abb. 22:	Verteilung des RIK nach intravesikaler Instillation von 1,85 MBq in gekauterte und ungekauterte Mäuse, 90 min nach Instillation	77
Abb. 23:	Nierenschnitte einer Nacktmaus a) nach i.p. Injektion von 4,44 MBq freiem ^{213}Bi und b) nach i.p. Injektion von 4,44 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK (jeweils rechts nativer Kryoschnitt mit Muskel, links Mikroautoradiographie)	78f
Abb. 24:	Kaplan-Meier-Diagramm xenotransplanteder untherapierter Nacktmäuse: Überlebenszeit nach intravesikaler Instillation von 2×10^6 Zellen EJ 28-luc (n=10)	80
Abb. 25:	Kaplan-Meier-Diagramme xenotransplanteder Nacktmäuse nach ^{213}Bi -Immuntherapie mit a) 0,925 MBq 1h, 7d und 14d nach Zellinstillation und b) 0,37 MBq 1h und 7d nach Zellinstillation im Vergleich zur untherapierten Kontrollgruppe	82f
Abb. 26:	Kaplan-Meier-Diagramm xenotransplanteder Nacktmäuse nach Mitomycin C-Therapie 1h und 7d nach Zellinstillation im Vergleich zur untherapierten Kontrollgruppe	84
Abb. 27:	Kaplan-Meier-Diagramme xenotransplanteder Nacktmäuse: Vergleich des Überlebens nach Therapie mit $40\mu\text{g}$ Mitomycin C mit a) 0,925 MBq und b) 0,37 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK 1h und 7d nach Zellinstillation in Bezug zur untherapierten Kontrollgruppe	86
Abb. 28:	Biolumineszenz Imaging eines Urothelkarzinoms 7 Tage nach Zellinstillation und 7 Tage nach intravesikaler Therapie mit 0,925 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK (14 Tage nach Zellinstillation)	87
Abb. 29:	Urothelkarzinom 14 Tage nach Zellinstillation und dieselbe Maus, 7 Tage und 35 Tage nach intravesikaler Therapie mit 0,925 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK	88

-
- Abb. 30: Graphische Darstellung der quantifizierten Lichtsignale der Tumorzellen bei drei ausgewählten Tieren 1 Tag vor und 7 Tage nach Therapie mit jeweils 0,925 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk, a) 7d-Gruppe, b) 14d-Gruppe 89f
- Abb. 31: Immunhistochemische Anfärbung des EGF-Rezeptors. Links: Urothelkarzinom (braun angefärbter EGF-Rezeptor), rechts: unverändertes Urothel einer Kontrollmaus 91
- Abb. 32: Immunhistochemische Anfärbung des EGF-Rezeptors des humanen Harnblasenkarzinoms (braun). Gut sichtbar die drei Schichten (Urothel, Lamina propria, Tunica muscularis) der murinen Blasenwand (blau) 92
- Abb. 33: a) Murine Blase, uringefüllt, mit Tumor (weisser Pfeil) an Urethramündung und nachfolgender Urethraobstruktion b) Blasentumor, weit in das Lumen vorwachsend, ohne Obstruktion der Urethra, mit deutlicher Vaskularisation 98f

10 DANKSAGUNG

Prof. Dr. Dr. Reingard Senekowitsch-Schmidtke: Meinen herzlichsten Dank für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas. Für die überragende Betreuung dieser Arbeit, für Ihr Engagement, Ihre Geduld und Ihr Vertrauen und nicht zuletzt für Ihr einzigartiges Talent, durch Ihre Fürsorge und Freundlichkeit unsere Arbeitsgruppe zu einer Familie zu machen, möchte ich Ihnen danken.

Dr. Christof Seidl: Für Deine sorgfältigen fachkundigen Hilfestellungen und fundierte Korrekturen, für immer neue Ideen und für den ruhenden Pol, den Du für mich darstellst, danke ich Dir. Und für Deine Gabe, auf Deinem Schreibtisch - der allwissenden Müllhalde - immer alles zu finden, was man sucht... Op all wat da kumme weed – leever zwei Kölsch! Diese Sätze gebe ich Dir übrigens nicht zur Korrektur... ʘ !



Prof. Dr. med. vet. Wolfgang Schmahl: Für Ihr Interesse an diesem Thema, die Übernahme und Vertretung der Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität möchte ich mich sehr herzlich bei Ihnen bedanken. Sie haben der Arbeit den letzten Schliff gegeben. Ihr Humor, Ihre Warmherzigkeit und Ihre Erklärung der Metaplasie wird mir immer in Erinnerung bleiben...

Dr. Roswitha Beck: Ich wollte Dir den Spass an der kurativen Praxis vermitteln. Stattdessen hast Du mir mit Deiner fachkundigen Anleitung den Spass an der Forschung vermittelt! Durch Dich habe ich die wohl netteste, familiärste und kollegialste Arbeitsgemeinschaft kennengelernt, ich danke Dir!

Jan Müller: Du hast immer alles stehen und liegengelassen, wenn es darum ging, mir zu helfen. Excel ohne Dich: Es war ein Buch mit sieben Siegeln... Ich danke Dir und wünsche Dir für Deine Zukunft alles erdenklich Gute!

Dr. Dieter Saur: Für die Transfektion der Zelllinie und für die Bereitstellung des Gerätes für die Biolumineszenz-Aufnahmen meinen herzlichsten Dank.

Dr. Michael Autenrieth: Mein Dank gilt Ihrem Interesse an dieser Arbeit und der jederzeit freundlichen Unterstützung aus der Urologischen Klinik und Poliklinik.

Annette Frank, Birgit Blechert, Ulrike Schwaiger, Sabine Pirsig: Vielen Dank für Eure Hilfe und praktische Unterstützung, wenn mal wieder eine Hand zu wenig war. Für Unmengen an Kaffee und für die stets aufmunternden Worte, wenn mal etwas nicht so lief, wie man es sich vorgestellt hat.

Dr. Florian Gärtner: Ich danke Dir für die anregenden Gespräche, so manche gute Ideen und Deinen Humor zur rechten Zeit! Weisste Bescheid, ne?!

Julia „Gucci“ Lebschi, Dr. Sebastian Müller, Dr. Mario Vallon: Ich danke Euch für Eure Unterstützung bei den Versuchen. Und für einen sehr lustigen, kurzweiligen Gedanken- austausch, meistens weit jenseits der Dissertationsthemas... Und wo die Harnblase beim Menschen liegt – dat kreije mer später...!

Tibor Schuster vom Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie: Vielen Dank für Deine detaillierten statistischen Auswertungen, das kann eben nur ein Profi!

Peter Pfost: Ohne Deine Hilfe wäre das Projekt Dissertation gar nicht erst möglich gewesen. Ich danke Dir ausserdem für geduldig offene Ohren, mit denen Du meine verbalen Entgleisungen ertragen hast, wenn es mal wieder kleinere EDV-Probleme gab. Ohne Dich hätte ich die Arbeit mit der Schreibmaschine tippen müssen...

Meiner unglaublichen Familie ein grosses Dankeschön! Ihr habt mich immer und in allen Dingen unterstützt. Und ganz genau gewusst, wann ihr zur rechten Zeit zum Tritt in den Allerwertesten ausholen müsst. Dieh Häzz ess ne Nümaat, ding Kralle sinn spetz, un wenn ich fall, dann bess du mieh Netz...

Tanja Wurm: Was wäre ich ohne Dich! Ich danke Dir für die professionelle Durchsicht des Summary. Und für die beständige und immerwährende Begleitung auf dem „Rollercoaster named life“ seit über 30 Jahren...

Dr. Dieter Zerndt: Du bist mehr als nur mein Onkel. Vielen Dank für Deine seelische und moralische Unterstützung in den letzten Jahren!

Lena Kaiser, M.D.: Für Deine Rückenstärkung, Dein Zuhören und die sehr anregenden Gespräche danke ich Dir! Du kanns zaubre, irjendsujet muss et sin...

Rosi K., Sandra K., Tanja W., Silvia M., Claudia W., Claudia M., Britta S., Hilli H. und Ivonne M.: Mädels, was soll ich noch sagen? Ihr steht zu mir, bei Licht und Schatten – jederzeit. Um solche Freunde kann man mich nur beneiden!

Loula, Mara, Pino, Gracy und Sammy: Danke für kilometerlange Ausritte, Spaziergänge, Entspannung und kuscheliges Fell, das mir jederzeit bereitwillig zum Kraulen zur Verfügung gestellt wurde. Als ob es selbstverständlich wäre.

Die kleinsten, aber wichtigsten Hauptdarsteller dieser Arbeit, die Mäuse: Sie sind nicht gefragt worden... Ihnen gilt mein Dank und Respekt. Mit ihrer Hilfe erst können grosse Fortschritte gemacht werden. Für Menschen und Tiere.

Mein besonderer Dank gilt der **Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG (SE 962/2-4; SE 962/3-1)**: Ohne die finanzielle Unterstützung wäre die Durchführung dieser Studie nicht möglich gewesen.

DANKE

„Der Mensch zeigt sein wahres Gesicht erst im Umgang mit dem Tier.“

Jochen Kielholz

Lebenslauf

Birgit Pfost, geb. Kielholz
geboren am 14. Juli 1969 in Bonn / Nordrhein-Westfalen

Schulbildung:	1976 – 1980	Grundschule Troisdorf
	1980 – 1989	Gymnasium Troisdorf-Sieglar
	17.05.1989	Allgemeine Hochschulreife
Studium:	1990 – 1998	Lehramtsstudium an der Universität zu Köln
	19.06.1998	Staatsexamen
	1999 – 2005	Tiermedizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	20.01.2005	Staatsexamen
	08.02.2005	Tierärztliche Approbation
Dissertation:	2005 – 2008	Doktorandin und wissenschaftliche Angestellte an der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Senekowitsch-Schmidtke
Berufstätigkeit:	seit 01.02.2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München